

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS MALEIMÍDICOS:
RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIADIPOGÊNICA**

Daiane Rosolen

Orientadora: Profa. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa
Co-orientadora: Profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro

Florianópolis
2014.

Daiane Rosolen

**CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS MALEIMÍDICOS:
RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIADIPOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro

Florianópolis

2014.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosolen, Daiane

CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS MALEIMÍDICOS: RELAÇÃO ENTRE
A ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIADIPOGÊNICA / Daiane
Rosolen ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa ;
coorientadora, Fabíola Filippin-Monteiro. - Florianópolis,
SC, 2014.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Melanoma. 3. Maleimidas. 4.
Citotoxicidade. 5. Atividade Antiadipogênica. I.
Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II. Filippin-Monteiro,
Fabíola. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

DAIANE ROSOLEN

**CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS MALEIMÍDICOS:
RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL E
ANTIADIPOGÊNICA.**

Dissertação julgada adequada para a obtenção do Título de MESTRE em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação

Comissão Examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Dra. Ana Campa
Universidade de São Paulo (USP) - Membro Titular

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

Florianópolis, 10 de março de 2014.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Marcio, meu amor, companheiro e grande incentivador por todo apoio, ajuda e compreensão, com toda certeza não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim.

Aos meus pais, Nadir e Ivete pelo amor incondicional, pelas palavras de incentivo e apoio, aos meus irmãos Daniel e Débora pelo carinho mesmo que de longe estiveram sempre presentes nesta minha trajetória.

A minha orientadora Tânia pela oportunidade de ingressar em seu “super grupo”, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, experiência, sabedoria e pelo significativo aprendizado científico durante o mestrado.

A minha co-orientadora Fabíola por ter guiado meus passos na parte experimental e dividir cada etapa do trabalho comigo. Obrigada pelos ensinamentos e por me mostrar os caminhos da pesquisa.

Aos meus queridos colegas do laboratório GEIMM, minha segunda família, obrigada pela ajuda e ensinamentos com experimentos, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e obrigada por mudarem a minha vida.

A Syntia por ter me apresentado à Prof Tânia e por ter me guiado nos primeiros dias em Florianópolis.

Aos professores da UNIVALI Valdir Cechinel Filho e Vânia Noldin pela colaboração e síntese dos derivados maleimídicos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou a implementação deste trabalho;

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

RESUMO

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células que invadem o tecido circundante e podem produzir metástases em locais distantes do órgão afetado. Entre os tipos de câncer destaca-se o melanoma que é caracterizado pela proliferação anormal dos melanócitos e possui predominância em indivíduos de pele e olhos claros. O melanoma representa 4% das neoplasias malignas da pele, considerado grave devido à elevada propensão para produzir metástases. Tem sido relatado que a enzima ácido graxo sintase (FASN), responsável pela síntese endógena do ácido graxo palmitato, está superexpressa em células de melanoma e esta alta expressão está associada a um pior prognóstico. Também é relatado que o aumento desta enzima parece ser necessário para a proliferação e sobrevivência das células tumorais. Recentemente demonstramos que as imidas cíclicas, mais especificamente as maleimidas e seus derivados, possuem relevante atividade antitumoral *in vivo* e que esta atividade parece estar relacionada a modulação adipogênica e portanto, pode exercer influência na atividade da enzima FASN. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos derivados maleimídicos em diferentes linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-147) como também a atividade antiadipogênica em pré-adipócitos murinos 3T3-L1. Como resultados, observou-se que os derivados do ácido N-fenil-maleâmico apresentaram uma concentração citotóxica que promove a morte em 50% das células, $CC_{50} \geq 200$, enquanto que os derivados da N-fenilmaleimida mostraram uma CC_{50} de 10 a 32 μM para todas as linhagens de melanoma analisadas, sugerindo que o anel imídico é responsável pela referida atividade. Além disso, os compostos denominados M2 e M7, maleimidas com substituintes $-\text{H}$ e $-\text{OCH}_3$, respectivamente, mostraram-se três vezes mais seletivos para a linhagem SK-MEL-147 do que na linhagem não-tumoral de melanócitos. Ainda, o M2 e o M7 induziram a fragmentação de DNA na SK-MEL-28 e na SK-MEL-147, com maior expressão na segunda linhagem, sugerindo morte celular por apoptose. Na linhagem SK-MEL-147 os compostos M2 e M7 induziram a apoptose, como também a diminuição da expressão da FASN. Com relação a atividade antiadipogênica, o M2 e o M7 diminuíram a diferenciação celular de pré-adipócitos evidenciado pela diminuição de lipídios intracelulares. A partir destes resultados, conclui-se que os derivados da N-fenilmaleimida M2 e M7 foram capazes de induzir a apoptose em

células de melanoma humano e que este efeito pode estar relacionado, em parte, com a inibição da expressão gênica da enzima FASN.

Palavras-chave: melanoma, maleimidaz, FASN, citotoxicidade, atividade antiadipogênica.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled growth of cells that might invade surrounding tissues and metastasize to distant sites of the affected organ. Among cancers, melanoma is well known for abnormal proliferation that arises in melanocytes, which susceptibility correlates to a large degree with light skin, and eyes color. Melanoma represents 4 % of malignancies of the skin and is considered a severe disease due to intrinsic propensity to metastasize. It has been reported that the enzyme fatty acid synthase (FASN), responsible for the endogenous synthesis of fatty acids palmitate, is overexpressed in melanoma and this overexpression is generally correlated with poor prognosis. It is also reported that the increased expression of this enzyme seems to be necessary for the proliferation and survival of tumor cells. Recently, we demonstrated that cyclic imides, more specifically maleimides and derivatives, exerted important *in vivo* antitumoral activity. Likewise, we suggested that this activity seems to be related to modulations in adipogenic pathways and therefore, could alter the FASN activity. In view of this scenario, the aim of this study was to evaluate the cytotoxicity and the effect of the maleimides derivatives on FASN expression in different human melanoma cell lines (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-147), as well as, a possible anti-adipogenic activity in murine preadipocytes 3T3-L1. As results, it was observed that derivatives of N-phenyl-maleamic acids showed $CC_{50}s \geq 200$ while the derivatives of N- phenylmaleimide showed $CC_{50}s$ from 10 to 32 μM for all melanoma cell lines, suggesting that the imidic ring is responsible for that activity. Likewise, the compounds M2 and M7, derivatives with substituent $-H$ and $-OCH_3$ respectively, showed three-fold increment in selectivity for SKMEL-147 when compared with non-tumoral melanocytes. Furthermore, M2 and M7 induced DNA fragmentation in SK- MEL-28 and SK-MEL -147, more expressively in the last one, suggesting cell death by apoptosis. M2 and M7 also induced apoptosis in SK-MEL-147 cell line, as well as a decrease in FASN gene expression. Regarding anti-adipogenic activity, M2 and M7 decreased cell differentiation of pre-adipocytes by reducing the intracellular lipids amount. Taken together, we concluded that the derivatives M2 and M7 were capable to induce apoptosis in melanoma cell line and this activity is related, in part, to the inhibition FASN expression.

Keywords: melanoma, maleimides, FASN, cytotoxicity, anti-adipogenic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Progressão na transformação do melanócito.	24
Figura 2 – Melanoma maligno.	25
Figura 3 – Via das MAPK.	27
Figura 4 – Fases do ciclo celular.	28
Figura 5– Características morfológicas do processo de morte celular por apoptose.	31
Figura 6 – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.	33
Figura 7 - Características morfológicas do processo de morte celular por necrose.	34
Figura 8 – Mecanismo da obesidade relacionado ao câncer.	38
Figura 9 – Biossíntese de ácidos graxos.	39
Figura 10 – Progressão da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.	42
Figura 11 – Estrutura química do alcalóide natural filantimida.	43
Figura 12 – Síntese dos derivados maleimídicos.	43
Figura 13 – Estruturas químicas dos derivados maleimídicos.	44
Figura 14 – Variação de peso (g) apresentada pelos camundongos Swiss.	45
Figura 15 – Estrutura química dos derivados da N-fenil-maleimida (M2 e M7), dos derivados do ácido N-fenilmaleâmico (AC1 e AC3) e da quercetina.	48
Figura 16 – Linhagens celulares utilizadas.	50
Figura 17 – Desenho experimental.	57
Figura 18 – Ciclo celular nas linhagens SK-MEL-28 (A) e SK-MEL-147 (B).	64
Figura 19 – Quantificação de células nas diferentes fases do ciclo celular nas linhagens SK-MEL-28 (A) e SK-MEL-147 (B).	65
Figura 20 – Apoptose/necrose induzida pelos derivados da N-fenil-maleimida (M2 e M7) na linhagem SK-MEL-147.	67
Figura 21 – Expressão do gene FASN na linhagem celular SK-MEL-147.	70
Figura 22 – Análise do ciclo celular na linhagem 3T3-L1 após o tratamento de 24 h com 1 μ M dos compostos M2 e M7.	72

Figura 23 – Diferenciação de células 3T3-L1.	73
Figura 24 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos aos compostos M2 e M7 anterior a adição do MDI.	74
Figura 25 – Esquema de incubação das células 3T3-L1 com os compostos M2 e M7 durante a adição do MDI.....	76
Figura 26 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos ao composto M2 durante a adição do MDI.....	77
Figura 27 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos ao composto M7 durante a adição do MDI.....	78
Figura 28 – Microscopia de fluorescência de células 3T3-L1 diferenciadas expostas aos compostos M2 e M7 na concentração de 3 μ M durante o processo de diferenciação....	79
Figura 29 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos aos compostos M2 e M7 após a adição do MDI.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reação de qPCR.....	55
Tabela 2 – Citotoxicidade dos derivados da N-fenil-maleimida e dos derivados do ácido N-fenil-maleâmico nas linhagens celulares de melanoma.	61
Tabela 3 – Índice de seletividade dos derivados da N-fenil-maleimida baseado na citotoxicidade em linhagens de melanoma humano (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL147) e na linhagem não tumoral de melanócito NGM.....	63
Tabela 4 – Determinação da CC_{50} dos derivados da N-fenil-maleimida sobre a linhagem murina de pré-adipócito 3T3-L1.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC1	Ácido N-fenilmaleâmico
AC2	Ácido 4-metoxi-N-fenilmaleâmico
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator ativador de proteases-1
BRAF	Proto-oncogene BRAF (proteína cinase serina/treonina)
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CC ₅₀	Concentração Citotóxica que promove a morte em 50% das células
cDNA	DNA complementar
CDK	Ciclina dependente de cinase
CS	Soro de bezerro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK	Cinase ativada por sinal extracelular
FAS	Receptor de morte
FASL	Ligante do receptor de morte
FASN	Ácido graxo sintase
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAM F12	Meio de cultura Mistura Nutriente F12
INCA	Instituto Nacional de Câncer

IS	Índice de seletividade
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
N-RAS	homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma (v-ras)
MDI	Meio de diferenciação
M2	N-fenil-maleimida
M7	4-metoxi-N-fenilmaleimida
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NGM	Linhagem celular de Melanócito humano
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SK-MEL-19	Linhagem celular de melanoma humano
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SK-MEL-147	Linhagem celular de melanoma humano
UV	Radiação ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Objetivo Geral.....	25
1.2 Objetivos Específicos	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Melanócitos.....	23
2.2 Melanoma	24
2.3 Ciclo celular	27
2.3.1 Controle do ciclo celular.....	28
2.4 Morte celular	30
2.4.1 Apoptose	30
2.4.2 Necrose	34
2.5 Tratamento do melanoma	35
2.6 Tecido adiposo, obesidade e câncer	36
2.6.1 FASN como alvo terapêutico no câncer.....	38
2.6.2 Modelo de Adipogênese (Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1).....	41
2.7 Imidas Cíclicas	42

3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1	Reagentes	47
3.2	Síntese dos compostos.....	47
3.3	Células e Condições de Cultura	49
3.4	Tratamento celular	50
3.5	Viabilidade Celular – Ensaio de MTT.....	50
3.6	Determinação da concentração citotóxica.....	51
3.7	Índice de Seletividade.....	51
3.8	Análise do ciclo celular	52
3.9	Método da Anexina-V-FITC e iodeto de propídio	52
3.10	Expressão gênica da FASN	53
3.10.1	Extração do RNA total	53
3.10.2	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	54
3.10.3	RT-PCR-convencional	54
3.10.4	Curva de eficiência da reação de PCR	54
3.10.5	Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)	55
3.11	Diferenciação celular da linhagem 3T3-L1.....	55
3.12	Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio na linhagem 3T3-L1.....	56
3.13	Análise estatística.....	56

3.14	Fluxograma experimental	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Atividade Antitumoral	59
4.1.1	Citotoxicidade	59
4.1.2	Ciclo celular	63
4.1.3	Morte celular – Apoptose/Necrose nas células SK-MEL-147	65
4.1.4	Expressão do gene FASN na SK-MEL 147	68
4.2	Atividade Antiadipogênia.....	70
4.2.1	Citotoxicidade	70
4.2.2	Análise do Ciclo celular	71
4.2.3	Diferenciação celular da linhagem 3T3-L1	72
4.2.4	Tratamento com derivados maleimídicos anterior a indução da diferenciação celular.....	73
4.2.5	Tratamento com derivados maleimídicos durante a diferenciação celular da linhagem 3T3-L1	74
4.2.6	Incubação com derivados maleimídicos após a indução da diferenciação celular	79
5.	CONCLUSÕES.....	81
5.1	Perspectivas	82
	REFERÊNCIAS....	83
	APÊNDICE A.....	99
	APÊNDICE B.....	101

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células que invadem o tecido circundante e podem produzir metástases em locais distantes do órgão afetado. As células dividem-se rapidamente, tendem a ser agressivas e incontroláveis, favorecendo a formação de tumores malignos que podem afetar qualquer parte do organismo (WHO, 2014). As causas podem ser variadas, destacam-se as externas que estão relacionadas ao meio ambiente, aos hábitos ou costumes próprios de um indivíduo, como também causas internas que podem ser pré-determinadas geneticamente (INCA, 2014a).

Nos últimos anos, o câncer alcançou uma grande dimensão tornando-se um evidente problema de saúde pública. No Brasil, o câncer torna-se relevante pelo perfil epidemiológico que apresenta. Estimativas para o ano de 2014 apontam a ocorrência de 580 mil novos casos (INCA, 2014b). Muitos tipos de câncer podem ser prevenidos, evitando a exposição aos fatores de risco, como é o caso do melanoma. Além disso, uma porcentagem significativa de cânceres pode ser curada, especialmente se forem detectados precocemente (WHO, 2014). Segundo o INCA (2014a), se os cânceres fossem detectados em fases iniciais 30% dos casos poderiam ser prevenidos.

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no País. O melanoma maligno cutâneo representa 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à alta possibilidade de produzir metástases (INCA, 2014c).

O melanoma é caracterizado pela proliferação anormal de melanócitos que podem invadir a membrana basal. Por ser uma doença agressiva, possui diversas opções de tratamento, mas a resposta terapêutica ainda permanece em patamares baixos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; MURRELL e BOARD, 2013). Neste sentido, justifica-se o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com o objetivo de melhorar tanto a taxa de cura, quanto a qualidade de vida dos pacientes.

Nos últimos anos, vários estudos têm apresentado evidências de uma forte associação entre a obesidade e o aumento do risco de câncer. No entanto os mecanismos que ligam as duas doenças ainda não estão totalmente compreendidos (PRIETO-HONTORIA *et al.*, 2011; BOEING, 2013).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC – *International Agency for Researchon Cancer*), pesquisas epidemiológicas sugerem que a obesidade está associada a um alto risco de desenvolver vários tipos de câncer, incluindo o câncer de cólon, esôfago, mama, endométrio, rim, fígado, vesícula biliar e pâncreas.

Estudos anteriores relataram que a enzima ácido graxo sintase (FASN) responsável pela síntese endógena de ácidos graxos, possui um envolvimento na oncogênese de alguns tipos de câncer. A FASN está superexpressa em vários tumores sólidos, inclusive no melanoma. Também é relatado que o aumento desta enzima parece ser necessário para a proliferação e sobrevivência das células tumorais (LUPU e MENENDEZ, 2006; MENENDEZ e LUPU, 2007; SEGUIN *et al.*, 2012; LOUIE *et al.*, 2013).

Alguns derivados maleimídicos vem sendo estudados pelo nosso grupo como possíveis agentes citotóxicos, e em trabalhos anteriores (NOLDIN, 2011), foi verificado que dois deles provocaram alterações de peso nos animais em experimentação, em ensaios com modelo *in vivo* de melanoma. Desta observação surgiu a pergunta se as alterações metabólicas observadas poderiam estar relacionadas com a atividade antitumoral.

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citotóxica de derivados maleimídicos em linhagens celulares de melanoma humano, como também verificar a atividade antiadipogênica dos compostos em linhagem de pré-adipócito 3T3-L1, buscando estabelecer uma possível relação entre o melanoma e a adipogênese por meio da expressão da FASN.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a atividade citotóxica e antiadipogênci*a in vitro* de derivados maleímidicos em diferentes linhagens celulares de melanoma e células relacionadas a adipogênese.

1.2 Objetivos Específicos

- a. Comparar o efeito citotóxico dos derivados maleímidicos M2, M7, AC1 e AC3, entre as linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL 19, SK-MEL 28 e SK-MEL 147) e uma linhagem celular não tumoral (NGM);
- b. Avaliar os mecanismos de citotoxicidade do M2, M7, AC1 e AC3 por meio das alterações do ciclo celular e da ocorrência de morte celular (apoptose/necrose) nas diferentes linhagens de melanoma;
- c. Avaliar a expressão gênica da ácido graxo sintase (FASN) nas linhagens de melanoma tratadas com os derivados maleímidicos;
- d. Avaliar o potencial antiadipogênico dos derivados maleímidicos frente a linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1.

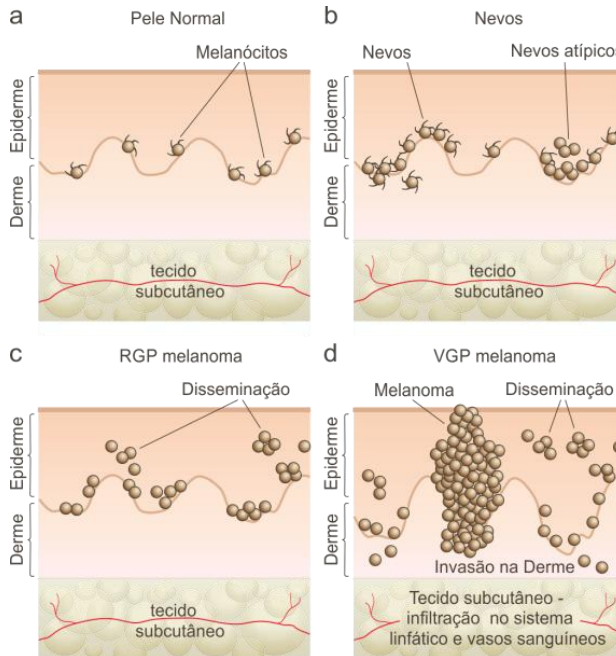
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melanócitos

Os melanócitos são células pigmentadas que produzem melanina, o pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo. Originam-se de progenitores da crista neural que são altamente móveis e migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário. Os melanócitos residem na camada basal da epiderme, nos folículos capilares e a homeostase é regulada por queratinócitos epidérmicos. Em resposta a luz ultravioleta (UV), os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência dos melanócitos por meio da diferenciação, da proliferação e da motilidade, estimulando-os a produzir melanina (DUPIN e LE DOUARIN, 2003; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; ERNFORS, 2010). Deste modo, os melanócitos promovem um papel fundamental na proteção da pele contra os efeitos nocivos da radiação UV, como também na prevenção do câncer de pele. Indivíduos que apresentam ausência de melanócitos funcionais, como é o caso do vitiligo e do albinismo são hipersensíveis à radiação UV, e apresentam grande suscetibilidade ao melanoma. Contudo, os melanócitos são os precursores do melanoma, pois podem proliferar e espalhar-se levando a formação de nevos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; ERNFORS, 2010). Os nevos são manchas hiper-pigmentadas congênitas ou adquiridas que podem surgir em locais diferentes e apresentar tamanhos variados. São caracterizados por múltiplas máculas castanho escuro que podem ser planas ou elevadas (CORRADIN *et al.*, 2014).

Os nevos são geralmente benignos mas podem progredir para a fase de crescimento radial (RGP) do melanoma, que apresenta uma lesão intra-epidérmica que pode promover micro invasões na derme. Estas células (RGP) podem progredir para a fase de crescimento vertical (VGP), estágio de maior gravidade clínica em que apresentam potencial metastático e de invadir a derme, progredindo diretamente para o melanoma maligno (Figura 1) (MILLER e MIHM, 2006).

Figura 1 – Progressão na transformação do melanócito.



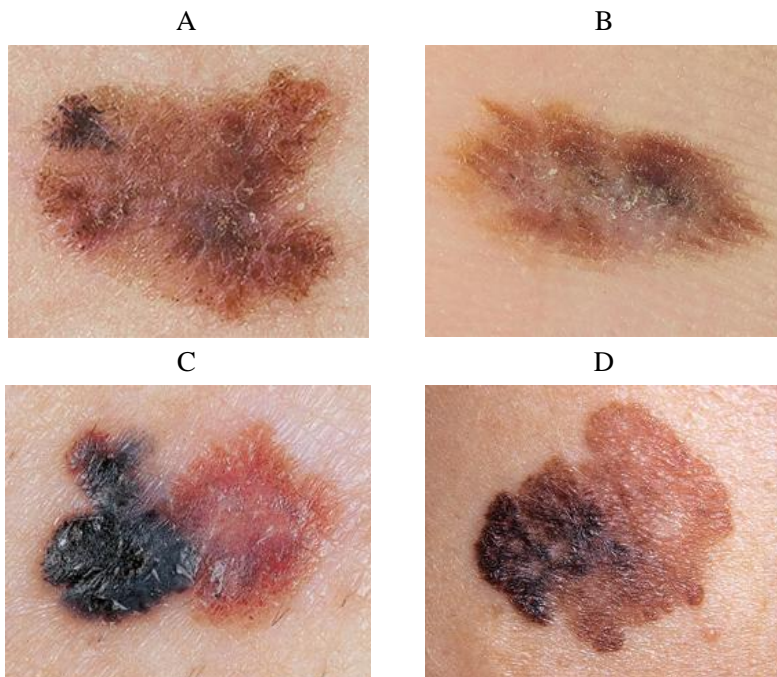
a) Pele normal. Distribuição dos melanócitos dendríticos dentro da camada basal da epiderme. b) Nevos melanocíticos benignos ocorrem devido ao aumento do número de melanócitos dendríticos. c) Fase de crescimento radial (RGP), fase maligna primária. d) Fase de crescimento vertical (VGP), considerada como maligno, conduz diretamente ao melanoma metastático.

Fonte: Adaptada de Gray-Schopfer *et al.*(2007).

2.2 Melanoma

O melanoma maligno é a principal causa de morte por câncer de pele (Figura 2). Os fatores de risco correlacionam-se com as características genéticas e ambientais do indivíduo. Sabe-se que um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma é a exposição excessiva à radiação UV, que acomete com maior frequência pessoas de pele e olhos claros (ALI et al., 2013).

Figura 2 – Melanoma maligno.



Lesões cutâneas apresentando assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração variada (C) e diâmetro igual ou superior a 5 mm (D).

Fonte: MEF (2014).

Um fator importante para o desenvolvimento do melanoma é a presença de nevos atípicos, que podem apresentar bordas irregulares, coloração variada e diâmetro igual ou superior a 5 mm (Figura 2) (WAGNER *et al.*, 2000). Os nevos melanocíticos desenvolvem-se principalmente no período da infância e adolescência, devido à exposição solar, o tipo de pele e a reação após a exposição solar, além da herança genética (GARBE e EIGENTLER, 2007). Gilchrest *et al.* (1999) salientaram que a incidência do melanoma tem aumentado em pessoas com idade avançada devido ao acúmulo de mutações nos melanócitos que impulsionam a carcinogênese.

A metástase é a principal causa de mortalidade por melanoma. Geralmente, 7 a 20% dos pacientes diagnosticados apresentam metástase. Entre os locais mais frequentes para o surgimento destes

tumores secundários destacam-se o fígado, os ossos e o cérebro (TAS, 2012). Gray-Schopfer *et al.* (2007) relataram que se o melanoma for diagnosticado precocemente pode ser curado por meio de ressecções cirúrgicas, caso contrário, com a progressão da doença para estágios metastáticos é extremamente difícil de ser tratado pois o paciente apresenta dificuldades em responder a terapêutica. Ainda, Arozarena *et al.* (2011), relataram que o melanoma metastático apresenta resistência às terapias existentes e possui um prognóstico ruim, com uma taxa de sobrevida média entre 6 a 9 meses e uma sobrevida global de aproximadamente 5 anos.

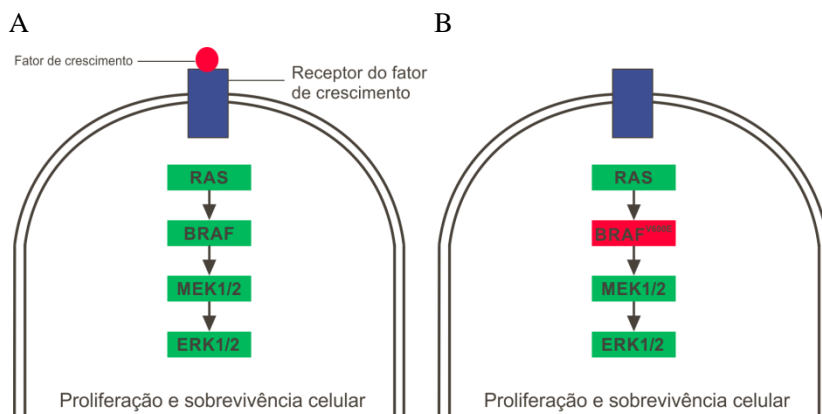
Descobertas na sinalização celular têm proporcionado uma maior compreensão da biologia do melanoma. Esses avanços estão sendo explorados para fornecer medicamentos específicos e novas abordagens terapêuticas para o tratamento (NIKOLAOU *et al.*, 2012). Desta forma, torna-se importante a busca pelo entendimento das vias moleculares e mutações desta doença.

Uma das mutações importantes observadas no melanoma ocorre na proteína p53. Uma das principais funções desta proteína é manter a transdução de sinais na morte celular programada (apoptose) (HAUPT *et al.*, 2003; HUSSEIN *et al.*, 2003). Danos celulares como a luz ultravioleta, radiação ionizante, hipóxia e estresse oxidativo levam a ativação da p53 permitindo que a apoptose ocorra. Mas nos casos em que esta proteína está mutada, as funções antitumorais são reprimidas, causando desestabilização nas suas atividades transcricionais. Mutações na p53 ocorrem em aproximadamente 50% dos cânceres, inclusive no melanoma. A frequência da mutação em melanomas é estimada entre 4 e 25%, baixa quando comparada com outros tipos de câncer (BENJAMIN e ANANTHASWAMY, 2007; BOX e TERZIAN, 2008).

Uma via de sinalização importante no melanoma é a MAPK (Proteína cinase ativada por mitógenos) (Figura 3), conhecida como via das MAP cinases que contém as proteínas RAS/RAF/MEK/ERK. A RAS é uma pequena proteína ativada por fatores de crescimento, citocinas e receptores hormonais, sendo responsável pela ativação da proteína RAF. A RAF fosforila e ativa a MEK que promove a ativação de uma terceira proteína, a ERK (Figura 3) (TAKATA e SAIDA, 2006; JOVANOVIC *et al.*, 2009). Em células não tumorais esta via regula a proliferação, sobrevivência e diferenciação, enquanto que no melanoma está constitutivamente ativada, e a sobrevivência e a proliferação celular são favorecidas (AROZARENA *et al.*, 2011).

A família RAS divide-se em N-RAS, K-RAS e H-RAS e a RAF em ARAF, BRAF e CRAF. Aproximadamente 25% dos melanomas carregam mutações N-RAS e mutações BRAF são encontradas em 60% dos melanomas (INAMDAR *et al.*, 2010). As mutações N-RAS mais frequentes no melanoma envolvem a substituição da glutamina por arginina no códon 61 (Q61R) e as mutações BRAF mais comuns no melanoma envolvem a substituição do ácido glutâmico por valina (V600E). A BRAF^{V600E} promove a ativação da via das MAPK estimulando a proliferação e sobrevivência (Figura 3), como também, fornecendo funções de crescimento e de manutenção essenciais para o tumor, tornando-se um alvo terapêutico para o tratamento do melanoma (DAVIES *et al.*, 2002; SMALLEY, 2003; JOVANOVIC *et al.*, 2009).

Figura 3 – Via das MAPK.



A) Ativação normal da via. B) BRAF mutante (BRAF^{V600E}) conduz a ativação da via em aproximadamente 60% dos melanomas.

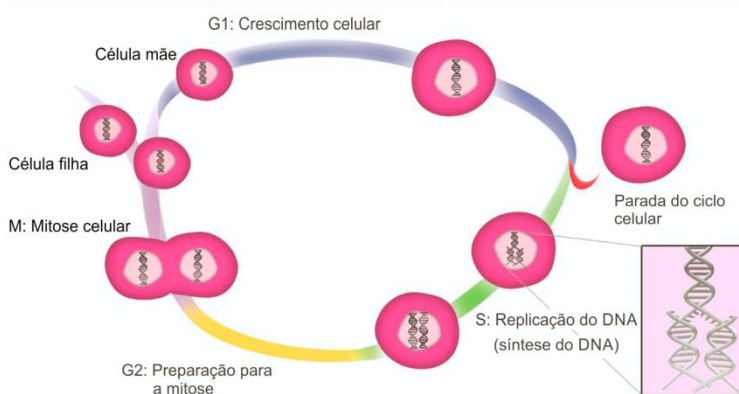
Fonte: Adaptado de Murrel e Board (2013).

2.3 Ciclo celular

O ciclo celular consiste em uma sequência ordenada de eventos que duplicam o material genético de uma célula e depois a dividem. Este processo destinado à duplicação e a segregação do genoma demanda muita energia dividindo-se em duas etapas principais: intérfase e mitose (NORBURY e NURSE, 1992).

A intérfase corresponde às fases G1, S e G2. É um período caracterizado pelo contínuo crescimento celular e replicação do DNA (NORBURY e NURSE, 1992). Durante a fase G1, a célula está metabolicamente ativa em contínuo crescimento e se prepara para a síntese de DNA quando ocorre a descondensação dos cromossomos mas sem replicação do material genético. Em seguida, na fase S (síntese) ocorre a replicação do DNA nuclear, etapa importante para a divisão celular. Na fase subsequente G2, a célula cresce e sintetiza proteínas para a divisão celular. Durante a mitose (fase M) ocorre a separação para duas células. As células em G0 são denominadas quiescentes ou em estágio de dormência, pois neste período são desprovidas de fatores de crescimento e mantêm um baixo metabolismo permanecendo fora do processo de divisão celular (Figura 4) (COLLINS e GARRETT, 2005).

Figura 4 – Fases do ciclo celular.



Fonte: Adaptada de Mahmoudiet al (2011)

2.3.1 Controle do ciclo celular

O controle do ciclo celular é extremamente importante para que as fases ocorram em uma sequência determinada. Portanto, para garantir a progressão adequada do ciclo, as células desenvolveram uma série de pontos de checagem que as impedem de entrar em uma nova fase até que tenham concluído com êxito a anterior. Por exemplo, antes das células estarem no ponto de transição G2/M, é fundamental que a

replicação tenha sido completada e possíveis danos do DNA tenham sido completamente reparados. A fase G2 é um dos pontos de checagem bem definidos do ciclo celular, pois nesta fase a célula permanece até o momento em que o genoma seja totalmente replicado antes de ser transmitido às células filhas (MALUMBRES e BARBACID, 2001).

Na fase G1, destaca-se outro ponto de checagem. No momento em que o DNA danificado é detectado, ocorre a interrupção do sistema permitindo que o reparo seja feito antes que a célula entre na fase S, impedindo assim, a replicação do DNA danificado (MALUMBRES e BARBACID, 2001). Portanto, salienta-se que defeitos na regulação do ciclo celular, como nos pontos de checagem e nos genes de reparação do DNA, principalmente mutações, estão associados ao melanoma (BROUSTAS e LIEBERMAN, 2014). Contudo, defeitos nos mecanismos dos pontos de checagem foram identificados em melanomas e provavelmente são responsáveis pelo aumento das mutações (PAVEY *et al.*, 2013). A maioria das linhagens celulares de melanoma apresentam defeitos significativos nos pontos de checagem G1 ou G2, que podem surgir em melanomas com alterações genéticas distintas. Assim, durante o desenvolvimento do melanoma há pelo menos duas maneiras em que a função dos pontos de checagem pode ser perturbada, a inativação do ponto de checagem G1 por mutações BRAF/NRAS e no ponto de checagem G2 que está associado com mutações BRAF (KAUFMANN *et al.*, 2007). Ainda, é importante salientar que embora as mutações em p53 sejam esporádicas no melanoma, alterações na via de sinalização desta proteína pode contribuir com a carcinogênese por meio de defeitos no reparo do DNA, como a função nos pontos de checagem do ciclo celular ou na apoptose (KASTAN e BARTEK, 2004).

As proteínas que regulam todo este processo têm sido extensivamente caracterizadas (MALUMBRES e BARBACID, 2001), sendo que as principais envolvidas são as cinases dependentes de ciclina (CDK), uma família de serina/treonina cinases que são ativadas em pontos específicos durante o ciclo celular. O complexo ciclina-Cdk como é chamado, regula atividade de várias proteínas envolvidas na replicação do DNA e na mitose, fosforilando-as em sítios específicos, ativando algumas e inibindo outras para que desta forma os eventos do ciclo celular sejam bem coordenados (COLLINS e GARRETT, 2005).

2.4 Morte celular

Os mecanismos de sobrevivência e morte celulares estão intimamente relacionados à progressão tumoral nos melanomas e as características moleculares que levam a este escape mitogênico descontrolado estão relacionadas às alterações nos processos de morte celular (BROWN e ATTARDI, 2005; DEGTEREV e YUAN, 2008).

Segundo o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD – *Nomenclature Committee on Cell Death*), os tipos de morte são classificados baseando-se na morfologia da célula, como apoptose, necrose e mitose catastrófica. O NCCD ainda propõe uma classificação funcional para os tipos de morte, elucidando a apoptose extrínseca, apoptose intrínseca dependente e independente de caspase, necrose regulada, autofagia e mitose catastrófica (GALLUZZI *et al.*, 2011).

Entre os tipos de morte destaca-se a apoptose, que reflete a decisão de uma célula para morrer em resposta a estímulos, e a necrose, que é causada por estresse, sendo incompatível com a sobrevivência da célula. Portanto, danos reversíveis ou irreversíveis podem levar a apoptose ou necrose, dependendo da intensidade e duração da injúria pela qual a célula foi submetida (DEGTEREV e YUAN, 2008).

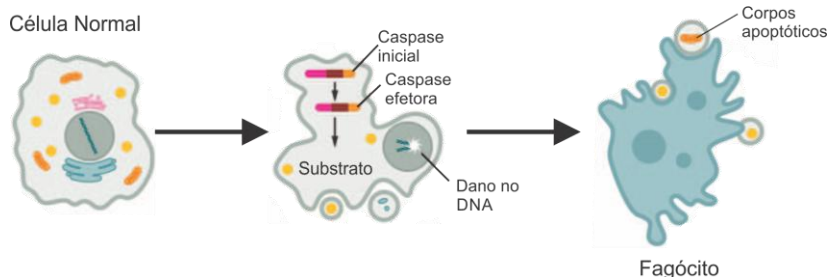
2.4.1 Apoptose

Apoptose, palavra de origem grega que significa “cair fora” (ELMORE, 2007), é conhecida como morte celular programada que requer energia e não envolve inflamação. É essencial e está associada aos processos de desenvolvimento embrionário, funcionamento do sistema imunológico e manutenção da homeostase dos tecidos em organismos multicelulares. É um programa fisiológico conhecido como “suicídio celular” que possui um mecanismo de defesa para remover células infectadas, mutadas ou que sofreram algum dano, prevenindo doenças como o câncer (OKADA e MAK, 2004; PORTT *et al.*, 2011).

Fesik (2005), relatou que a falta de regulação deste processo pode perturbar o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, levando ao início da carcinogênese e progressão tumoral. Em diversos tipos de câncer, as proteínas pró-apoptóticas possuem mutações de inativação ou a expressão das proteínas anti-apoptóticas está regulada positivamente, conduzindo a um crescimento descontrolado do tumor e a incapacidade de responder aos danos celulares.

A apoptose é caracterizada por diversas alterações morfológicas. A primeira a se destacar é a condensação da cromatina em massas granulares compactas que se ligam a carioteca. Em seguida, o citoplasma condensa-se por diminuição do volume celular e as organelas ficam mais densas e permanecem intactas, resultando no encolhimento celular. O núcleo se rompe seguido de fragmentação do DNA dando origem aos corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos (Figura 5) (KRYSKO *et al.*, 2008; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

Figura 5– Características morfológicas do processo de morte celular por apoptose.



Fonte: Adaptada de Fink e Cookson (2005).

Entre os eventos bioquímicos mais observados durante o processo apoptótico, destaca-se a ativação de caspases (Figura 5), ativação de nucleases, desestabilização do citoesqueleto e externalização da fosfatidilserina. Desta forma, há duas vias em que as caspases podem ser ativadas, pela via intrínseca (mitocondrial) ou por meio da via extrínseca (receptores de morte) (FERRI e KROEMER, 2001).

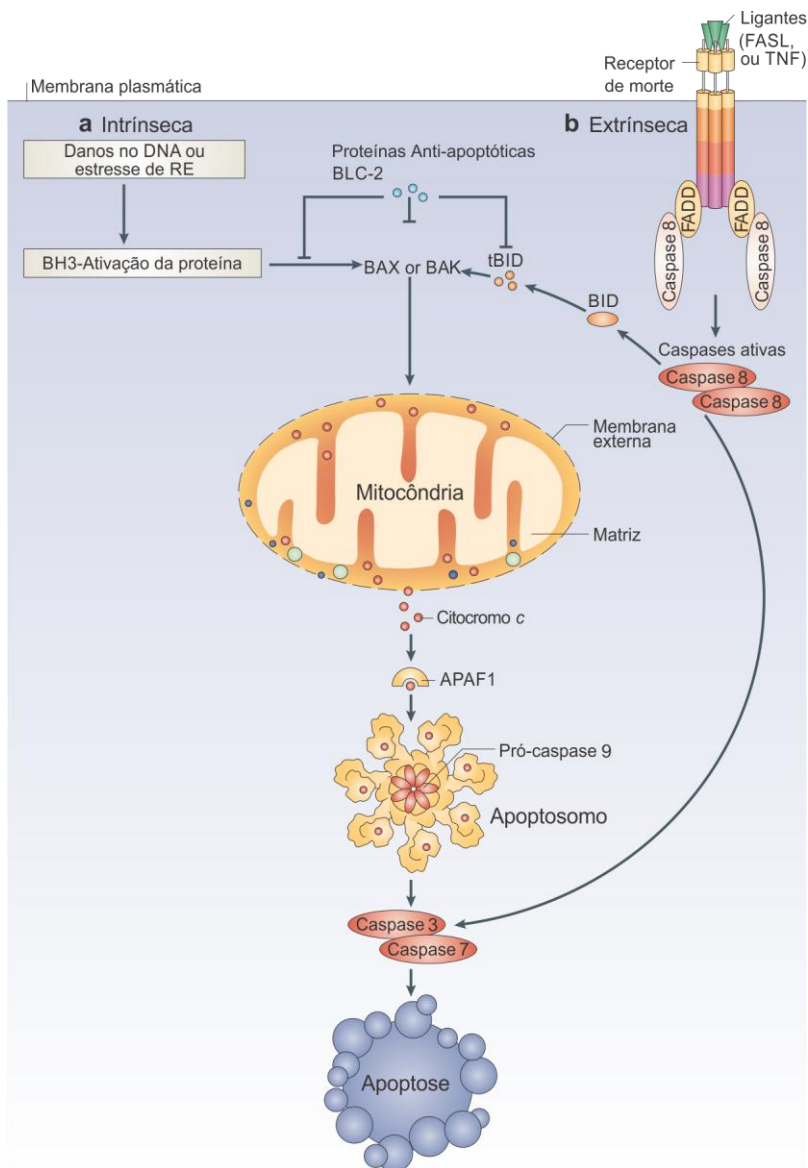
A via intrínseca é desencadeada por diferentes agressões extracelulares e intracelulares, tais como a hipóxia, danos no DNA e indução de oncogenes. Os sinais em resposta a estas agressões

convergem principalmente sobre a mitocôndria. Desta forma, uma série de eventos bioquímicos são induzidos, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa, liberação do citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas, com consequente formação do apoptossomo (um grande complexo de proteínas que contém o citocromo *c*), como também o fator de ativação de protease apoptótica 1 (APAF1) e caspase-9, a qual promove a ativação das caspases efetoras 3 e 7, que medeiam a apoptose (Figura 6) (OKADA e MAK, 2004; TAIT e GREEN, 2010).

A via extrínseca é ativada pelo envolvimento de receptores de morte com os seus ligantes na superfície da célula, como o FASL e o fator de necrose tumoral (TNF), que conduzem ao recrutamento de moléculas adaptadoras tais como a proteína FAS, associado ao domínio de morte (FADD). Isto resulta na dimerização e a ativação da caspase 8, a qual pode então clivar e ativar diretamente as caspases 3 e 7, que conduzem a apoptose (Figura 6) (OKADA e MAK, 2004; TAIT e GREEN, 2010).

Segundo Fesik (2005), a base de muitos estudos relacionados com substâncias antitumorais está direcionada a compostos que sejam capazes de promover a morte celular por apoptose, por ser um processo fisiológico. Wong (2011), também salienta que a apoptose desempenha um papel importante no tratamento do câncer, uma vez que é um alvo comum de muitas estratégias terapêuticas.

Figura 6 – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptada de Tait e Green (2010).

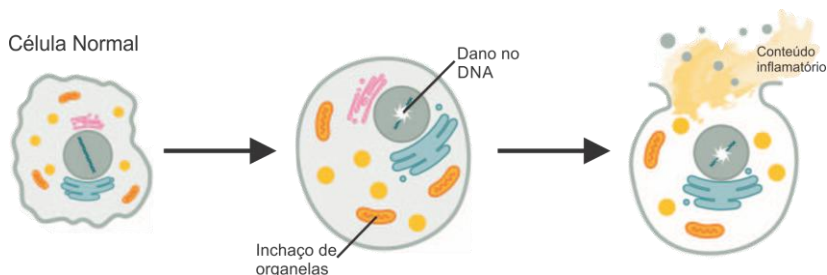
RE - Retículo endoplasmático.

2.4.2 Necrose

A palavra necrose também é originária do grego e quer dizer “estado de morte”. É o ponto final das alterações celulares, resultado de dano celular irreversível, em que a homeostase não pode ser restabelecida. Este tipo de morte celular está relacionado com agressões que levam à lesão na membrana e pode ser causada por agentes físicos, químicos e agentes infecciosos (BRASILEIRO FILHO e BOGLIOLO, 1998).

Quanto às características morfológicas neste tipo de morte, destacam-se danos celulares, incluindo a distorção da membrana, a degradação de organelas, inchaço celular com destruição da célula e consequente liberação de componentes intracelulares (Figura 7) (OKADA e MAK, 2004).

Figura 7 - Características morfológicas do processo de morte celular por necrose.



Fonte: Adaptada de Fink e Cookson (2005).

A necrose foi considerada por vezes como um mecanismo de morte celular acidental (GALLUZZI *et al.*, 2011), envolvendo um processo desregulado e “confuso” (OKADA e MAK, 2004). Entretanto, diversos estudos nesta área têm sugerido que a necrose também pode ocorrer de forma regulada, chamada de “necroptose”. Este tipo de morte é muito comum *in vivo*, não só em traumas físicos, mas principalmente em diversas formas de neurodegeneração e morte celular causadas por isquemia ou infecção. Além disso, pesquisas têm revelado que ao contrário da necrose não-regulada, estes processos de morte fisiológicos e programados como a necroptose compartilham vários processos chave com a apoptose (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

Proskuryakov *et al.* (2003) salientaram que apesar da necrose aparentemente ser uma forma violenta de morte celular e levar à inflamação, não deve ser considerada de forma negativa, pois a indução da necrose pode ser uma forma de proteção contra o câncer e infecções quando a apoptose não atua suficientemente, assim a indução da inflamação pode ser uma alternativa efetiva.

2.5 Tratamento do melanoma

Entre as opções terapêuticas para o tratamento do melanoma destacam-se as ressecções cirúrgicas, quimioterapia, imunoterapia (associação das duas –bioquimioterapia) e também a radioterapia como terapia adjuvante (JEMAL *et al.*, 2008; MOUAWAD *et al.*, 2010).

Na quimioterapia convencional, os agentes comumente utilizados são os alquilantes (dacarbazina, temozolomida, nitrosouréias), análogos da platina (cisplatina, carboplatina) e toxinas microtubulares (vincas e taxanos), que têm sido utilizados isoladamente ou em combinação (BHATIA *et al.*, 2009). Lui *et al.* (2007) relataram que a dacarbazina foi aprovada como principal agente monoterápico para o tratamento do melanoma, estando associada a uma taxa de resposta de 15%. Tarhini e Agarwala (2006), salientaram que os fármacos como paclitaxel e cisplatina também mostraram atividade na monoterapia, mas com baixa efetividade.

Na imunoterapia o Interferon- α é o agente mais comumente utilizado, embora a eficácia ainda seja uma questão em debate. Altas doses de interleucina-2 também foram aprovadas, mas as taxas de resposta são baixas e a toxicidade é um grande problema (TARHINI e AGARWALA, 2006).

Em 2012 a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO – *American Society of Clinical Oncology*) relatou dados de um estudo randomizado em pacientes com melanoma metastático e enfatizou que na bioquimioterapia a associação de cisplatina, vimblastina, dacarbazina, interferon e interleucina-2 aumentaram a sobrevida de recidiva mas não demonstraram um impacto significativo na sobrevida global dos pacientes (FOX *et al.*, 2013). No Brasil, os centros que adotam tal estratégia utilizam o mesmo esquema (cisplatina, dacarbazina, vimblastina, interleucina-2 e interferon). São descritas taxas de resposta da ordem de até 50% e sobrevida prolongada em cerca de 6% dos pacientes, em especial entre os que obtiveram resposta completa (MS, 2013).

No que diz respeito a radioterapia, o melanoma é historicamente considerado um tumor resistente quando comparado a outros tipos de câncer. A radioterapia mantém-se útil para casos de tumores irresssecáveis, principalmente na região da face, da cabeça e do pescoço, deste modo, permanece como uma modalidade de tratamento paliativo (GUADAGNOLO e ZAGARS, 2009).

Para Gra-Schopfer *et al.* (2007), estas terapias contribuem para o tratamento do melanoma, mas com uma taxa de sobrevida global muito baixa, de modo que a identificação dos caminhos de sinalização que são centrais para a iniciação e progressão da doença, está abrindo uma nova área de tratamento, como é o caso dos inibidores da BRAF.

Um exemplo de fármaco dessa classe é o vemurafenibe (Zelboraf[®]), inibidor da BRAF^{V600E}. Este fármaco foi aprovado pelo FDA em 2011 para o tratamento monoterápico do melanoma metastático (CHAPMAN *et al.*, 2011). O estudo de Chapman *et al.* (2011) comparou o tratamento entre o vemurafenibe e o quimioterápico dacarbazina em 675 pacientes com mutação BRAF positiva para melanoma metastático. A taxa de resposta para o tratamento com vemurafenibe foi de 48% em comparação com 5% para a dacarbazina, e a média de sobrevida global melhorou de 9,6 meses com quimioterapia para 13,2 meses com vemurafenibe. Ainda, Choiet *al.* (2013) expuseram, que o vemurafenibe mesmo sendo clinicamente eficaz por aumentar a sobrevida do paciente está limitado pelo rápido aparecimento de resistência, a qual se desenvolve invariavelmente.

No Brasil, o Ministério da Saúde não recomenda o uso do vemurafenibe visto não haver evidência de claro benefício global em termos de sobrevida para os pacientes (MS, 2013).

As terapias atuais contribuem para o tratamento do melanoma mas ainda são ineficientes, desta forma, o desenvolvimento de terapias específicas e personalizadas, uma vez conhecendo a natureza das mutações presentes em cada caso, são visualizadas como uma estratégia interessante.

2.6 Tecido adiposo, obesidade e câncer

A obesidade é uma síndrome complexa causada pela interação de vários fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida e fatores ambientais, o que favorece a um balanço energético positivo crônico, levando ao aumento da massa de gordura corporal (PRIETO-HONTORIA *et al.*,

2011). É uma epidemia mundial associada a uma série de complicações secundárias e doenças concomitantes, tais como diabetes mellitus, doença cardiovascular, distúrbios do sono inclusive o câncer. De certo modo, a obesidade é simplesmente vista como uma manifestação fenotípica de um comportamento falho da ingestão de alimentos, com a consequência da absorção de energia, no entanto vários estudos tem demonstrado que a obesidade é complexa e multifatorial (JAUCH-CHARA e OLTMANNS).

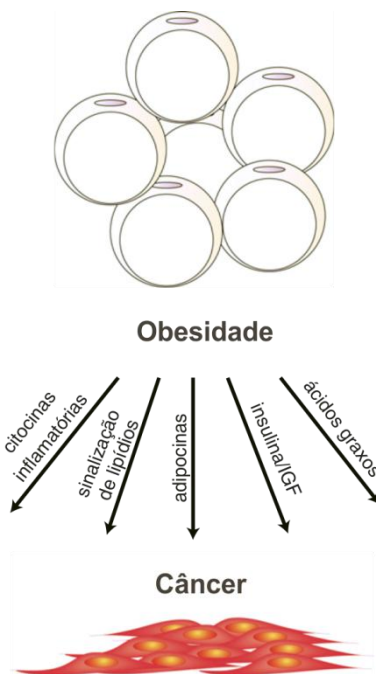
Na obesidade ocorre o armazenamento de gordura com a elevação da massa adiposa, a qual é determinada pelo aumento no tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou aumento do número de células (hiperplasia). Diante deste desequilíbrio energético, vários estudos observaram uma relação entre obesidade e câncer (PERCIK e STUMVOLL, 2009; DONOHOE *et al.*, 2010). Em 2002, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) avaliou a relação entre o peso corporal e o câncer e concluiu que alguns tipos de câncer poderiam ser prevenidos, apenas evitando-se o ganho de peso (IARC, 2002).

O tecido adiposo possui propriedades funcionais bem distintas, por esta razão é classicamente dividido em dois tipos: tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco. Ambos estão envolvidos no balanço energético, mas enquanto o primeiro é especializado na dissipação de energia na forma de calor, o segundo está principalmente envolvido na estocagem de energia na forma de triacilgliceróis (QUEIROZ, 2009).

O tecido adiposo branco é o principal reservatório energético do organismo, o qual é constituído por adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, células do estroma vascular, fibroblastos, leucócitos e macrófagos. Além disso, é considerado como um potente órgão endócrino por secretar adipocinas (como a leptina, adiponectina e grelina), fatores de crescimento (IGF-1, IGF-BPs, TGF- β), citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e Interleucina-6), entre outros (GILBERT e SLINGERLAND, 2013).

Segundo Louie *et al.* (2013), um dos principais mecanismos pelo qual a obesidade leva a patogênese do câncer, é a utilização dos lipídios pelas células cancerígenas devido a um descontrole na atividade da enzima ácido graxo sintase (FASN) (Figura 8). O aumento desta enzima parece ser necessário para promover os efeitos malignos, tais como a proliferação e a sobrevivência celular, inclusive no melanoma.

Figura 8 – Mecanismo da obesidade relacionado ao câncer.



As células cancerosas aumentam a lipogênese por meio de níveis elevados da FASN. A obesidade causa inflamação e liberação de citocinas inflamatórias, além disso, leva a desregulação de adipocinas estimulando o crescimento do tumor.

Fonte: Adaptada de Louie *et al* (2013).

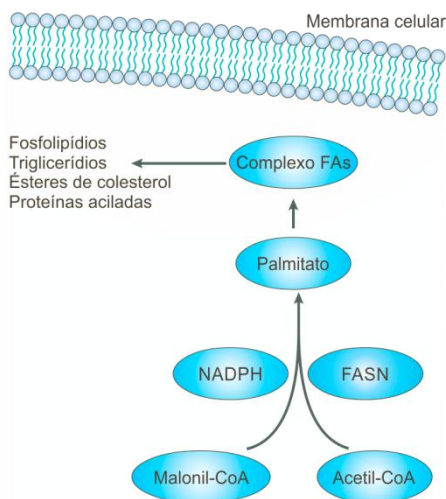
2.6.1 FASN como alvo terapêutico no câncer

Novas abordagens terapêuticas estão sendo pesquisadas, principalmente alvos específicos para o tratamento do melanoma. Entre estes, destaca-se a FASN, uma enzima metabólica codificada pelo gene FASN, responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados (WILENTZ *et al.*, 2000; SMITH, 2006).

Os ácidos graxos são constituintes essenciais de todos os lipídios de membrana e são substratos importantes para o metabolismo energético. Contudo, a principal função da FASN é catalisar a síntese de palmitato a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA na

presença de NADPH gerando longas cadeias de ácidos graxos saturados (Figura 9) (WILENTZ *et al.*, 2000).

Figura 9 – Biossíntese de ácidos graxos.



A FASN executa a condensação da acetil-CoA e malonil-CoA, dependente de NADPH, para produzir o ácido graxo palmitato, que irá compor fosfolípidios, triglicerídios, ésteres de colesterol e proteínas aciladas.

Fonte: Adaptada de Menendez e Lupu (2007).

Em adultos, a FASN tem sido considerada como uma enzima de menor importância pois os ácidos graxos saturados são adquiridos de forma abundante por meio da dieta. Por este motivo, a atividade desta enzima nas células e tecidos é ausente ou significativamente baixa, exceto no fígado, na mama durante a lactação, no pulmão fetal e no tecido adiposo (KUHAJDA, 2000). Entretanto, em células tumorais a expressão é aumentada, devido à necessidade de um maior aporte energético, principalmente nas variantes mais agressivas de algumas neoplasias, incluindo o melanoma (MENENDEZ e LUPU, 2007).

O papel da FASN no câncer foi descoberto em 1994 como um marcador molecular encontrado em pacientes com câncer de mama (KUHAJDA *et al.*, 1994). Desde então, estudos têm demonstrado que além do câncer de mama, a expressão aumentada da FASN também tem sido associada com a progressão do câncer, metástase, maior risco de

recidiva e menor sobrevida em um espectro de cânceres (MENENDEZ e LUPU, 2007), como o melanoma (DE ANDRADE *et al.*, 2011), o câncer de próstata (ROSSI *et al.*, 2003), as neoplasias ovarianas (GANSLER *et al.*, 1997), sarcoma de tecidos moles (TAKAHIRO *et al.*, 2003), adenocarcinoma ductal pancreático (ALO *et al.*, 2007) e carcinoma coloretal (OGINO *et al.*, 2008). Esses achados levam a hipótese de que a via de síntese de ácidos graxos pode contribuir com a tumorigênese e que a alta expressão da FASN está associada a um prognóstico ruim, principalmente no melanoma (KRIDEL *et al.*, 2007; MIGITA *et al.*, 2009). Além disso, Baron *et al.* (2004), salientaram que a alta atividade dessa enzima favorece o crescimento celular em neoplasias, diante disso, a inibição da FASN torna-se um importante alvo terapêutico.

Neste sentido tem-se observado que diferentes inibidores da FASN foram reportados como agentes antitumorais, como é o exemplo da cerulenina e o respectivo análogo sintético C75, orlistate, triclosan e a epigallocatequina-3-galato (KAPUR *et al.*, 2005; MENENDEZ e LUPU, 2007; SEGUIN *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que a cerulenina induziu o bloqueio da FASN em células cancerígenas, apresentando uma citotoxicidade seletiva e morte celular por apoptose (KUHAJDA *et al.*, 1994; PIZER *et al.*, 1996; PIZER *et al.*, 1998). O C75 foi relatado com mecanismo similar, mas com uma melhor estabilidade química e especificidade (KUHAJDA, 2000). A epigallocatequina-3-galato, principal componente do chá verde, foi relatada como um potente inibidor da FASN, por diminuir a síntese endógena de ácidos graxos, inibindo o crescimento e induzir a apoptose em células cancerígenas (BRUSSELMANS *et al.*, 2003; LIN e LIN-SHIAU, 2006). Já o triclosan, que por muito tempo tem sido utilizado como antibiótico em sabonetes, destacou-se por reduzir a viabilidade celular em células de câncer de mama (LIU *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003).

Finalmente, o orlistate, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como um medicamento antiobesidade, foi descoberto como um inibidor seletivo da atividade da FASN. O bloqueio da enzima demonstrou uma potente ação antiproliferativa e pró-apoptótica em culturas celulares de câncer de mama, próstata, colo, estômago e ovário, não afetando células normais (KRIDEL *et al.*, 2004; MENENDEZ *et al.*, 2005).

De fato, o aumento da expressão e atividade da FASN, tem sido reconhecido como um novo marcador de câncer agressivo e representa

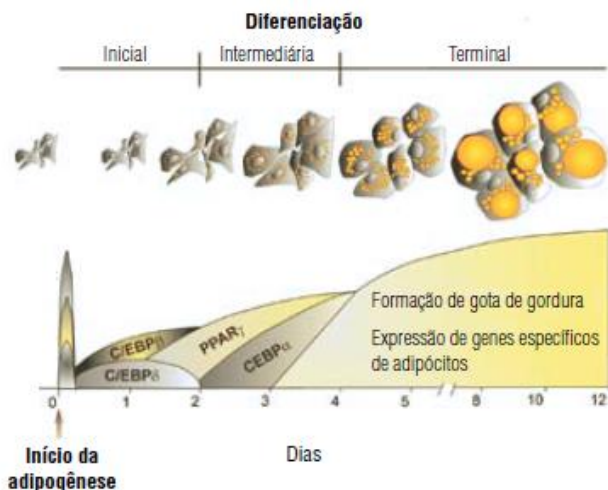
uma das alterações mais frequentes nesta doença, deste modo, somando-se entre as novas armas terapêuticas contra o melanoma (MENENDEZ e LUPU, 2007).

2.6.2 Modelo de Adipogênese (Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1)

A linhagem de pré-adipócito 3T3-L1 consiste em uma ferramenta útil para investigar o processo de adipogênese. É considerada "padrão ouro" para o uso como modelo na diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos maduros, pois reproduz fielmente as etapas da diferenciação celular (PRINS e O'RAHILLY, 1997; SCHMID *et al.*, 2005).

Destaca-se que o processo de diferenciação é controlado por duas famílias de fatores de transcrição, a *CAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs - C/EBP α , C/EBP- β e C/EBP- δ) e o PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptors*) (ROSEN *et al.*, 2000). Os fatores de transcrição C/EBP- β e C/EBP- δ são os primeiros a serem induzidos após a exposição das células ao MDI, estes ativam a expressão do receptor PPAR γ que é induzido durante o segundo dia e também induzem a expressão de C/EBP α que chega a expressão máxima durante o quarto e o quinto dia da diferenciação. Uma vez ativados, o PPAR γ e o C/EBP α , são os reguladores centrais da adipogênese e retroalimentam a indução de sua própria expressão (Figura 10). Assim, induzem a transcrição de centenas de genes anteriormente silenciosos, como enzimas e proteínas envolvidas na geração e na manutenção do fenótipo do adipócito, incluindo as que estão envolvidas no transporte de glicose, lipogênese, lipólise e síntese e secreção de adipocinas (NTAMBI e YOUNG-CHEUL, 2000; FARMER, 2006).

Figura 10 – Progressão da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.



Alguns estágios da diferenciação estão apresentados cronologicamente. Os fatores de transcrição (C/EBP- β , C/EBP- δ , PPAR γ e o C/EBP α) estão demarcados na base inferior esquerda representando o período de expressão gênica durante a diferenciação. No período final da diferenciação quando ocorre a formação da gota de gordura os PPAR γ e o C/EBP α também são expressos e uma vez ativados regulam um ao outro positivamente para manter a expressão gênica, apesar da redução da expressão induzem a transcrição de muitos genes do adipócito.

Fonte: Adaptado de Ntambi e Young-Cheul (2000).

2.7 Imidas Cíclicas

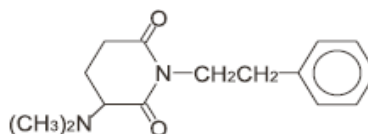
Na busca de novos fármacos que proporcionem maior eficácia, segurança e menores efeitos adversos para o tratamento de algumas doenças incluindo o câncer, o desenvolvimento de agentes terapêuticos advindos de produtos naturais e derivados sintéticos têm impulsionado incessantes pesquisas nesta área.

Nos últimos anos, a química medicinal tem evoluído e demonstrado diversas classes de compostos com promissoras atividades biológicas oriundas de produtos naturais, entre elas destacam-se as

imidas cíclicas (ANDRICOPULO *et al.*, 1998; CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

As imidas cíclicas são análogas ao alcalóide natural filantimida (Figura 11), isolado das partes aéreas da planta *Phyllanthus sellowianus* (TEMPESTA *et al.*, 1988). Tais compostos podem ser divididos em subclasses, incluindo as succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas, maleimidas e seus respectivos derivados (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

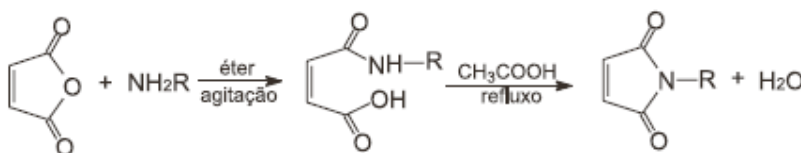
Figura 11 – Estrutura química do alcalóide natural filantimida.



Fonte: Cechinel Filho *et al.* (2003)

As maleimidas, conforme mencionado na revisão de Cechinel Filho *et al.* (2003), são imidas cíclicas, cuja síntese (Figura 12) está baseada na condensação do anidrido maleico com uma amina apropriada para a formação do ácido maleâmico, o qual pode ser ciclizado com uso de agentes desidratantes como o ácido acético. Estas reações permitem o uso de diferentes aminas, como as anilinas substituídas para a obtenção de derivados maleimídicos N – substituídos. Após a síntese, os derivados maleimídicos são purificados e elucidados para distinguir os sistemas cíclicos daqueles de cadeia aberta, como os ácidos âmicos.

Figura 12 – Síntese dos derivados maleimídicos.

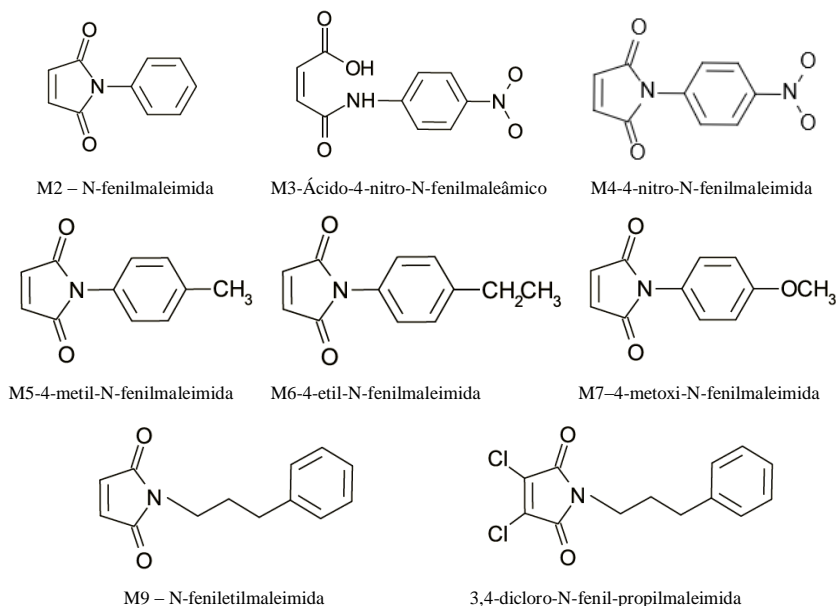


Fonte: Cechinel Filho *et al.* (2003).

As maleimidas e seus derivados possuem diferentes atividades biológicas, destacam-se as propriedades antifúngicas (SORTINO *et al.*, 2008), antibacterianas (CECHINEL FILHO *et al.*, 1994), antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2003) e antitumorais (PRADO *et al.*, 2004; YUNES *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por nosso grupo, Noldin (2011) analisou uma série de derivados maleimídicos (Figura 13), os quais foram testados *in vitro* em duas linhagens celulares (L1210 – leucemia linfoblástica aguda murina e B16F10 – linhagem de melanoma murino) e *in vivo* em um modelo de melanoma subcutâneo em camundongos Swiss.

Figura 13 – Estruturas químicas dos derivados maleimídicos.



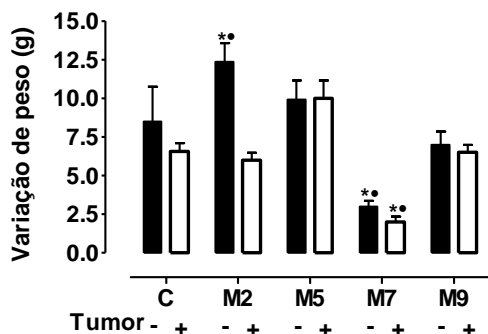
Fonte: Adaptado de Noldin (2011).

Os resultados demonstraram potencial citotóxico em células de melanoma murino B16F10, evidenciando efetiva ação antitumoral. Entre estes compostos, o M2 e o M7 apresentaram alta atividade

antitumoral (*in vitro*) e mostraram-se promissores na redução do crescimento tumoral (*in vivo*) (NOLDIN, 2011).

Os resultados ainda sugerem que os compostos possuem atividades biológicas importantes em modelos de melanoma, além de alterações no metabolismo energético com possíveis alterações em enzimas lipogênicas, por observar alterações de peso nos camundongos que não possuíam tumor e foram tratados com M2 e M7. Na Figura 14, é possível observar um aumento no peso dos camundongos sem tumor tratados com M2, enquanto que os tratados com M7 sofreram redução de peso. Os animais foram pesados antes e depois dos tratamentos com os compostos. Não foram observadas mudanças no comportamento dos camundongos no período em que foram tratados com as maleimidas que pudessem estar relacionados com a maneira que ocorreu a variação de peso, tão pouco indícios de edema.

Figura 14 – Variação de peso (g) apresentada pelos camundongos Swiss.



Barras escuras representam os animais sem tumor tratados com os derivados maleimídicos e as barras claras representam os animais com tumor tratados com os mesmos compostos. Os resultados representam média e desvio padrão (média ± DP). *P 0,05 (comparado com animais controle com tumor); **P 0,05 (comparado com animais controle sem tumor).

Fonte: Adaptado de Noldin(2011).

Com base nesses resultados, despertou-nos o interesse em investigar a atividade dos compostos M2 e M7 com o objetivo de pesquisar novos agentes antitumorais a partir de linhagens celulares de melanoma humano e avaliar uma possível atividade antiadipogênica

desses compostos a partir de uma linhagem celular de pré-adipócito murino.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

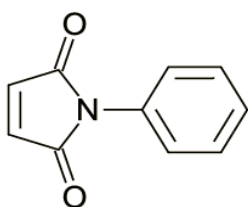
Os meios de cultura DMEM e HAM/F12, o soro fetal bovino (SFB), o soro de bezerro (CS), a penicilina, a estreptomicina e o TRIzol[®] foram adquiridos da Gibco[®] (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfóxido (DMSO) e o álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o cloreto de magnésio (MgCl₂), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de cálcio CaCl₂, o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); a sacarose, o etanol, o metanol, o clorofórmio e o álcool isopropílico foram adquiridos da Merck[®] (Alemanha); a anexina-V-FITC foi adquirida da BD; o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); a tripsina foi adquirida da Cultilab; azul de trypan, o triton-X100, o iodeto de propídeo (PI), a albumina bovina (BSA), o brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a hidrocortisona, a triiodotreonina, a insulina, a transferrina, o fator de crescimento epidermal (EGF), o oil red O, a dexametasona, a insulina, a isobutilmetilxantina IBMX) e a quercetina foram adquiridos da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Síntese dos compostos

Os derivados maleimídicos foram sintetizados pelo Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí/SC (UNIVALI) e cedidos pelo Professor Valdir Cechinel Filho.

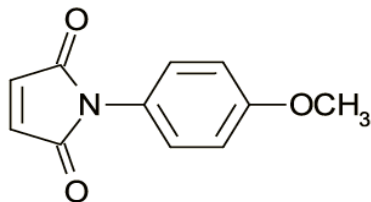
As estruturas químicas dos compostos utilizados neste trabalho estão representadas na Figura 15. Com exceção da quercetina, estas moléculas foram sintetizadas e caracterizadas conforme relatado na literatura (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003).

Figura 15 – Estrutura química dos derivados da N-fenil-maleimida (M2 e M7), dos derivados do ácido N-fenilmaleâmico (AC1 e AC3) e da quercetina.



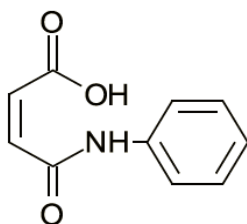
M2

N-fenil-maleimida



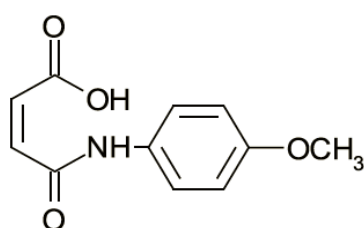
M7

4-metoxi-N-fenilmaleimida



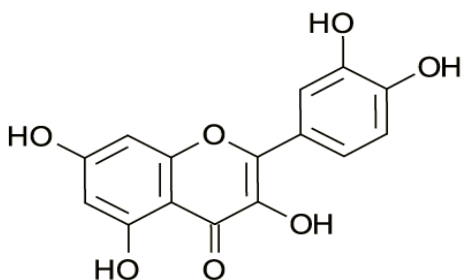
AC1

Ácido N-fenilmaleâmico



AC3

Ácido 4-metoxi-N-fenilmaleâmico



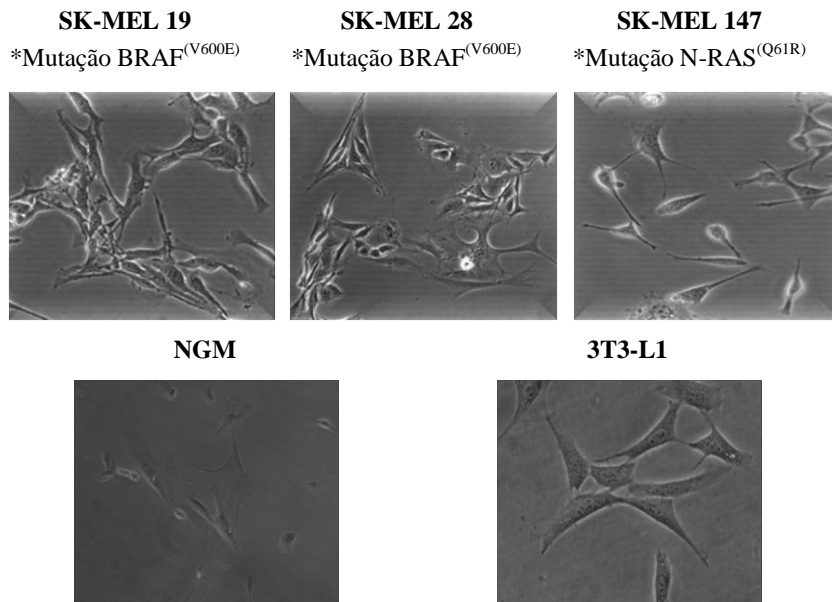
Quercetina

2-(3,4-d-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona

3.3 Células e Condições de Cultura

Foram utilizadas linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-147), uma linhagem não tumoral de melanócito humano (NGM) e uma linhagem murina de pré-adipócito 3T3-L1. A linhagem NGM foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ-UFRJ), as linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL147 e 3T3-L1 foram gentilmente cedidas pela Professora Ana Campa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - São Paulo (Figura 16). Para a cultura, as células foram mantidas em garrafas plásticas específicas contendo meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 mM de HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C com 5% CO₂. A linhagem NGM foi cultivada nas mesmas condições, com um meio de cultura diferenciado, o DMEM/HAM F12 (1:1) suplementado com 20% de SFB, 1,4 µM de hidrocortisona, 1nM de triiodotreonina, 10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 10 ng/ml de EGF, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 mM de HEPES. Para realizar os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão por Azul de Trypan, em que células não viáveis possuem comprometimento de membrana e coram-se de azul devido a incorporação do corante (FRESHNEY, 1987). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, o número de células e tempo de incubação foram adaptados para cada tipo de ensaio.

Figura 16 – Linhagens celulares utilizadas.



Aumento 200x exceto para 3T3-L1 400x.

* Brohem *et al.*(2012).

3.4 Tratamento celular

Os derivados maleimídicos foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados em alíquotas a 4°C. O tratamento foi realizado após a adesão das células em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo de cada experimento. E como controle foram utilizadas células sem tratamento (somente com meio). A quercetina foi dissolvida em DMSO, armazenada a 4°C e utilizada como controle positivo na concentração de 2 µM em ensaios realizados com a linhagem 3T3-L1. A concentração final de DMSO foi mantida sempre abaixo de 1%.

3.5 Viabilidade Celular – Ensaio de MTT

O ensaio do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é colorimétrico, clássico para avaliar a viabilidade

celular. Baseia-se na utilização do corante MTT que é convertido em um formazan púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. Portanto, a reação ocorre somente em células viáveis. O formazan púrpura formado é proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Para a realização deste ensaio, foram utilizadas placas de 96 poços onde as células (1×10^4 células/poço) foram incubadas em meio de cultura, em triplicata por 24 h, para adesão celular na placa. O tratamento com os compostos foi realizado nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 μM com incubação a 37°C por 24 h. Ao término desta incubação, o meio de cultura foi substituído pela solução de MTT (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e incubação adicional por 2 h a 37°C . Após esta etapa, a solução de MTT foi retirada e DMSO foi adicionado para solubilizar o precipitado formazan. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas (ELX800, Biotek, Vermont, EUA). A absorbância do grupo controle foi considerada como 100% de células viáveis.

3.6 Determinação da concentração citotóxica

Para determinar a concentração citotóxica, as células foram incubadas com os compostos (M2, M7, AC1 e AC3) em estufa umidificada a 37°C com 5% CO_2 em concentrações crescentes (1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 μM) por 24 h. Após o período de incubação seguiu-se com o ensaio de MTT. A CC_{50} (concentração citotóxica que promove a morte em 50% das células), foi calculada por meio de regressão não linear seguido de interpolação utilizando-se o *software GraphPad Prism* (La Jolla, CA, EUA).

3.7 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral e uma linhagem não tumoral. Neste trabalho, o IS foi calculado utilizando-se a CC_{50} de uma linhagem não tumoral de melanócito humano com as CC_{50} das linhagens celulares de melanoma humano pela seguinte equação:

$$IS = \frac{\text{CC}_{50} \text{ célula não tumoral}}{\text{CC}_{50} \text{ célula tumoral}}$$

3.8 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular permite que o conteúdo de DNA de cada célula possa ser medido e a distribuição celular estimada em cada fase do ciclo (TAVARES e TAVARES, 2009). As células são marcadas com iodeto de propídio, um corante fluorescente que se intercala ao DNA, e em seguida analisadas por citometria de fluxo. Para realizar esta análise, utilizou-se o método descrito por Yang *et al.* (2007) em que as células (5×10^5 /poço) foram incubadas com meio de cultura em estufa umidificada a 37 °C com 5% CO₂ em placa de 12 poços, por 24 h para adesão das células na placa. Em seguida foi realizada a incubação das células com a CC₅₀ dos compostos M2 e M7 por mais 24 h. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 200 x g por 10 min a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Nessa etapa, o sobrenadante foi novamente removido, foi adicionado etanol 70% seguido de incubação por 30 min a - 4°C para fixação das células. Adicionou-se PBS contendo BSA 2% para inibir ligações inespecíficas com o iodeto de propídio, seguido de centrifugação a 180 x g por 10 min a 25 °C. Descartado o sobrenadante, adicionou-se uma solução contendo RNase 100 µg/ml, 0,1% de Triton-X-100 em PBS, homogeneizado e transferido para tubos específicos para citometria de fluxo, que foram mantidos em gelo até a leitura. No momento da análise, as células foram marcadas com 20 µg/ml de iodeto de propídio. A análise do DNA foi realizada por meio de um citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e a população de células que corresponde a cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando-se o programa (WinMDI 2.9).

3.9 Método da Anexina-V-FITC e iodeto de propídio

O método da Anexina-V-FITC e iodeto de propídio é utilizado para distinguir células em apoptose e/ou necrose baseado nas diferenças de permeabilidade de membrana (VERMES *et al.*, 2000). A Anexina-V é uma proteína que conjugada ao fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) é utilizada como marcador de morte celular por apoptose. Esta proteína possui alta afinidade por fosfolipídios de membrana, como a fosfatidilserina que está localizada na camada interna da membrana celular (BEVERS *et al.*, 1999; GRANDMAISON *et al.*, 2004). Quando ocorre o processo apoptótico, a fosfatidilserina é translocada para a

região externa da membrana ficando exposta a marcadores celulares como a Anexina-V. Este evento ocorre nas fases iniciais da morte por apoptose, nas quais a membrana celular ainda encontra-se intacta. Por outro lado, o iodeto de propídio, um marcador nuclear fluorescente, intercala-se ao DNA quando a membrana celular já perdeu sua integridade, evidenciando as células em necrose (VERMES *et al.*, 1995; FALEIRO e LAZEBNIK, 2000; VERMES *et al.*, 2000). Para realizar este experimento, as células (5×10^5 /poço) foram incubadas com meio de cultura em estufa umidificada a 37 °C com 5% CO₂ em placa de 12 poços, por 24 h (para adesão na placa). Em seguida, foi realizada a incubação com a CC₅₀ dos compostos M2 e M7 por mais 24 h. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 200 x g por 10 min a 25 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 180 x g por 10 min a 4°C, procedimento realizado duas vezes para a remoção do meio. Posteriormente, o PBS foi descartado, as células foram homogeneizadas em tampão de ligação e marcadas com Anexina-V-FITC por 15 min à 4 °C. Em seguida foi adicionado o iodeto de propídio (20 µg/ml) para fazer a leitura em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). A população de células em cada quadrante (viáveis, apoptose, necrose e/ou apoptose tardia) foi analisada utilizando-se o programa Flowing 2.5.0.

3.10 Expressão gênica da FASN

Para os ensaios de expressão do gene da FASN, as células (1×10^6 /poço) foram incubadas com meio de cultura em estufa umidificada a 37 °C com 5% CO₂ por 24 h. Em seguida, foi realizado o tratamento com o M2 (5,5 e 11 µM) e com o M7 (5 µM) seguido de incubação por 4 h.

3.10.1 Extração do RNA total

As células foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o RNA total foi extraído com TRIZOL® (Gibco®). Em seguida, foi adicionado clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente, incubadas em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g (4 °C). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo no qual adicionou-se álcool isopropílico, seguido de incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 10 minutos a

12000 x g e o sobrenadante foi removido. O sedimento (RNA) foi lavado com etanol 75 % e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 7500 x g (4 °C). O sobrenadante foi removido, o sedimento (RNA) foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em água livre de RNase. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro Nano Vue® (GE Healthcare), sua pureza foi avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm e as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.10.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA utilizou-se o *kit High – Capacity DNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems) conforme protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 °C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). Todas as incubações foram realizadas em termociclador Biocycler (BioSystems, Curitiba, Brasil).

3.10.3 RT-PCR-convencional

Para verificar a melhor temperatura de amplificação com os iniciadores (primers), utilizou-se a técnica de PCR convencional seguindo as instruções do conjunto PCR 2X Master Mix (ThermoScientific®). Para a corrida, foi utilizado o gel de agarose 1% contendo Sybr Safe® (Invitrogen™). As temperaturas testadas foram 55 °C, 57 °C, 60 °C e 65 °C.

3.10.4 Curva de eficiência da reação de PCR

Com o intuito de determinar a eficiência da reação de PCR em tempo real, uma curva foi realizada com diferentes concentrações de cDNA para os pares de iniciadores (Tabela 1), para determinar a concentração ideal de cDNA e a eficiência dos iniciadores para a reação de quantificação. A amplificação foi realizada utilizando-se o Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)® conforme recomendação do fabricante. A eficiência das reações foi determinada de acordo com a inclinação da curva padrão do Log das diluições do cDNA *versus* a variação entre o ciclo de *threshold* (Ct) do gene alvo e do gene constitutivo (ΔCt), parâmetros fornecidos pelo *software* 7500 Fast System SDS (Applied Biosystem). O valor em

módulo, da inclinação da reta (*slope*) deve ser próximo de zero para que se admita que as eficiências de amplificação dos genes alvo e do gene constitutivo sejam similares. A partir destes critérios, pode-se utilizar o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reação de qPCR.

Genes	Sense	Anti-sense
FASN	5'-AGATCCTGGAACGAGAACACGAT-3'	5'-GAGACGTGTCACTCCTGGACTTG-3'
GAPDH	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

3.10.5 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

A expressão do gene FASN humano foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando GAPDH humano como controle endógeno e o Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)[®] conforme indicações do fabricante. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystem) nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para o término do processo de desnaturação e por fim pareamento e elongação dos iniciadores a 57 °C por 1 minuto. Para todos os experimentos o limiar de amplificação (Ct) foi determinado automaticamente pelo *software* 7500 Fast System SDS 2.4 (AppliedBiosystem).

3.11 Diferenciação celular da linhagem 3T3-L1

A adipogênese tem sido bastante estudada por meio de modelos celulares *ex vivo*. Entretanto, o modelo com a melhor caracterização utiliza pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 (células oriundas de embriões de camundongos suíços extraídas prematuramente). O processo de diferenciação é desencadeado por meio de um coquetel estimulante constituído de insulina (ativa receptores de IGF-1), dexametasona (ativa receptores de glicorticóides) e isobutylmetixantina (inibidor de cAMP fosfodiesterase), que compreende estágios precisamente controlados como a parada do ciclo celular, a divisão e a diferenciação celular (NTAMBI e YOUNG-CHEUL, 2000; FARMER,

2006; TANG e LANE, 2012). Para a diferenciação em adipócitos, as células 3T3-L1 (5×10^4 /poço) foram incubadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de CS (*Calf serum*) em estufa umidificada a 37 °C com 5% CO₂ em placa de 24 poços. Após a confluência as células foram estimuladas para a diferenciação mediante a adição de um meio de diferenciação (MDI) composto por 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1µM de dexametasona e 1,67 µM de insulina em DMEM suplementado com 10% SFB. Após 72 h, o meio foi trocado para DMEM contendo somente 10% SFB e 1,67 µM de insulina e trocado a cada dois dias por 8 dias. Após esta etapa, as culturas diferenciadas foram coradas com *OilRed O*, um corante de lipídeos e visualizadas microscopicamente.

3.12 Coloração com laranja de acridina e brometo de etídio na linhagem 3T3-L1

Para a observação de possíveis alterações morfológicas, as células da linhagem 3T3-L1 foram tratadas com os compostos M2 e M7 durante a adição do MDI. Após o processo total de diferenciação juntamente com os derivados da N-fenilmaleimida, as células foram expostas a uma solução contendo os corantes laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina - 1,2 µg/mL) e brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-phenilfenantridínio - 4 µg/mL). Células viáveis coram-se em verde e células necróticas coram-se em vermelho. Em seguida as células foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). Como grupo controle foram utilizadas células sem tratamento.

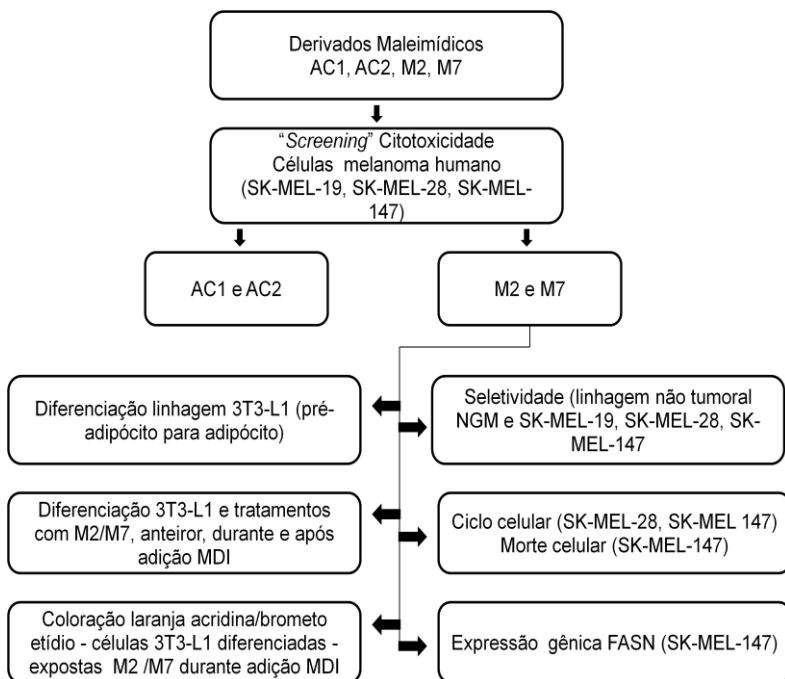
3.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média de determinações feitas em triplicata e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. As comparações estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância *one-way* ANOVA seguida do teste de Dunnet. A significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

3.14 Fluxograma experimental

A Figura 17 apresenta o desenho experimental deste trabalho.

Figura 17 – Desenho experimental.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos poucos agentes demonstraram atividade antitumoral significativa contra o melanoma, desta forma a busca por alternativas mais eficientes para contornar os efeitos indesejáveis e limitações apresentadas pelos tratamentos tem despertado o interesse de pesquisadores (YEZHELYEV *et al.*, 2006; INAMDAR *et al.*, 2010), inclusive a nossa. Entre as opções terapêuticas existentes para o melanoma, são raras as que atuam de forma específica e efetiva o suficiente para combater as metástases, quanto mais para aumentar a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência dos pacientes. Neste sentido, com o objetivo de contribuir na prospecção de novas terapias para o melanoma, este estudo com os derivados maleimídicos foi realizado em três linhagens celulares de melanoma humano e uma linhagem de pré-adipócito murino, buscando uma relação entre a ação antitumoral com a antiadipogênica.

4.1 Atividade Antitumoral

4.1.1 Citotoxicidade

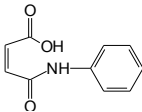
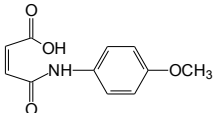
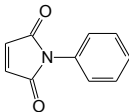
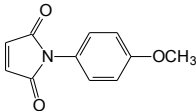
Para a avaliação dos derivados maleimídicos, realizou-se um estudo preliminar com os derivados da N-fenilmaleimida (M2 e M7) e seus respectivos ácidos (AC1 e AC2) em três linhagens de melanoma humano (SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-19). Os testes foram realizados com doze concentrações: 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 μM , em um tempo de incubação de 24 h e a CC_{50} (concentração citotóxica que promove a morte em 50% das células) dos compostos foi determinada em todas as linhagens celulares. Nesta avaliação foi possível observar que os derivados do ácido N-fenil-malêamico (AC1 e AC2) apresentaram valores de $\text{CC}_{50} \geq 200 \mu\text{M}$ em todas as linhagens celulares de melanoma, enquanto que os derivados da N-fenil-maleimida (M2 e M7) testados nas mesmas linhagens mostraram-se citotóxicos em baixas concentrações com CC_{50} de 10 a 32 μM (Tabela 2).

A baixa citotoxicidade apresentada pelos derivados do ácido-N-fenil-maleâmico foi caracterizada por Yunes *et al.* (2008) e Prado *et al.* (2004) que em seus estudos avaliaram a citotoxicidade de imidas cíclicas, inclusive maleimidas frente a linhagens celulares de leucemia humana e melanoma murino. Ao estudar a relação estrutura-atividade dos compostos, foi observada a importância da integridade do anel imídico para ocorrer o efeito citotóxico. O anel imídico obrigatoriamente precisa estar ciclizado, caso contrário, o composto perde a atividade. Além disso, os estudos sugerem a necessidade de que o anel imídico e o aromático devam estar próximos e diretamente ligados para promover a citotoxicidade.

Ainda, Cechinel Filho *et al.* (1994) relataram que o efeito citotóxico das imidas cíclicas pode estar relacionado com a dimensão e as características dos grupos substituintes no anel imida, o que pode modificar as propriedades eletrônicas e estéricas da molécula, alterando assim a potencial atividade. Sob este aspecto, vale salientar que com a inclusão do radical metoxi no grupo substituinte da molécula do composto M7 (Tabela 2), não foram observadas alterações quanto a citotoxicidade. Tanto o M2 quanto o M7 apresentaram valores de CC₅₀ baixos e similares nas três linhagens de melanoma estudadas.

Também salienta-se que os derivados da N-fenilmaleimida foram anteriormente estudados por nosso grupo, em que Noldin (2011) avaliou a citotoxicidade de alguns compostos em linhagens celulares de leucemia murina (L1210) e melanoma murino (B16F10). Os resultados mostraram que os compostos apresentaram efeitos citotóxicos para ambas as linhagens em concentrações de aproximadamente 10µM.

Tabela 2 –Citotoxicidade dos derivados da N-fenil-maleimida e dos derivados do ácido N-fenil-maleâmico nas linhagens celulares de melanoma.

Compostos	Estrutura química	CC ₅₀ μM		
		SK-MEL-19	SK-MEL-28	SK-MEL-147
AC1		250±25	200 ± 1,2	235 ± 22
AC3		240 ± 13	200 ± 12	234 ± 3,0
M2		19 ± 2,4	26 ± 1,8	11 ± 1,2
M7		32 ± 1,5	13 ± 2,0	10± 1,7

Dados expressos em média ± DP (n=3)

Diante dos resultados apresentados na Tabela 2, os compostos M2 e M7 foram selecionados para dar continuidade ao estudo por apresentarem maior citotoxicidade quando comparados com seus respectivos ácidos (AC1 e AC3).

Em seguida, realizou-se a avaliação da citotoxicidade com os compostos M2 e M7 em melanócitos (NGM) para a análise da seletividade. Os testes foram realizados com doze concentrações: 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 μM, em um tempo de incubação de 24 h. As CC₅₀s foram determinadas para o posterior cálculo do índice de seletividade. A Tabela 3 apresenta os valores de CC₅₀ dos derivados maleimídicos na linhagem não tumoral, como também nas linhagens tumorais. Na linhagem celular NGM, os derivados da N-fenil-maleimida apresentaram uma CC₅₀ entre 32 e 37 μM, enquanto que nas linhagens celulares de melanoma, estes valores foram menores, CC₅₀s entre 11 e 32 μM resultando em um índice de seletividade (IS) entre 1,1 e 3,7.

Além disso, observou-se que os compostos M2 e M7 apresentaram a maior citotoxicidade (CC_{50} 10 e 11 μ M) e os maiores IS (2,9 e 3,7, respectivamente) quando testados na linhagem SK-MEL-147 (Tabela 3). Os compostos M2 e M7 foram aproximadamente três vezes mais seletivos para as células de melanoma SK-MEL-147 do que para a célula não tumoral (melanócito NGM).

Da mesma forma que o presente trabalho, Brandão *et al.* (2013) também avaliaram a citotoxicidade de alguns compostos contra células de melanoma humano (UACC-62), melanoma murino (B16F10) e uma linhagem não tumoral de fibroblastos (NIH-3T3) com posterior determinação do IS. Foram testados nove ácidos derivados do líquen *Parmotrema dilatatum*. O ácido protocetrárico quando testado na linhagem UACC-62 apresentou uma CC_{50} de 1,4 μ M, enquanto que na linhagem não tumoral a CC_{50} foi de 129,6 μ M, resultando no maior IS (93) de todos os compostos testados. Os autores ainda salientam que as diferenças indicadas pelos valores de IS, possivelmente refletem interações do composto com sítios alvo das células de melanoma que não são observadas na célula não tumoral.

Na avaliação de Eldahshan (2013) o IS também foi determinado. O flavonóide rhoifolin (apigenin 7-O- β neohesperidosídeo) isolado da planta *Chorisia crispiflora* foi testado em quatro linhagens celulares tumorais (Hep2-carcinoma epidermóide de laringe humano, HeLa-carcinoma cervical humano, HepG2-carcinoma hepatocelular humano e HCT-116-carcinoma de cólon humano) e uma não tumoral (MRC-5-fibroblasto de pulmão fetal humano). Nas linhagens celulares HCT-116 e HepG2, o rhoifolin apresentou um IS de 1,43 e 2,21 respectivamente, quando comparadas à citotoxicidade da linhagem não tumoral. Já nas linhagens HeLa e Hep2, o composto apresentou os maiores IS, 8,06 para a primeira linhagem e 8,47 para a segunda. Ainda, no estudo de Prayong *et al.* (2008) foi verificado o IS entre a linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e a linhagem não tumoral VERO (células de rim de macaco verde Africano) quando submetidas aos extratos etanólicos de quatorze plantas Tailandesas. Nesse estudo foi observado que das quatorze plantas testadas, sete apresentaram IS entre 2,3 a 14,3. Assim como o M2 e o M7 avaliados no presente estudo, os compostos com maior IS mostraram-se mais seletivos nas linhagens tumorais do que nas linhagens não tumorais.

Nesta mesma linha de raciocínio, Koch *et al.* (2005) e Eldahshan (2013) relataram que um dos critérios importantes para a atividade de um fármaco na terapia do melanoma é que este agente possua efeitos

adversos mínimos ou ausentes em células não tumorais. Isto implica invariavelmente que o fármaco não deve ter apenas uma atividade potente caracterizada por concentrações mais baixas, mas também deve exibir um elevado grau de seletividade. Desta forma, o desenvolvimento de drogas seletivas é uma tarefa importante e desafiadora, como também compreender as diferenças biológicas entre células não tumorais e tumorais é essencial para alcançar este objetivo (ELDAHSHAN, 2013).

Tabela 3 –Índice de seletividade dos derivados da N-fenil-maleimida baseado na citotoxicidade em linhagens de melanoma humano (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL147) e na linhagem não tumoral de melanócito NGM.

Composto	CC ₅₀ μ M				Índice de seletividade (IS)		
	NGM	SK-MEL-19	SK-MEL-28	SK-MEL-147	NGM/ SK-MEL-19	NGM/ SK-MEL-28	NGM/ SK-MEL-147
M2	32 \pm 3,1	19 \pm 2,4	26 \pm 1,8	11 \pm 1,2	1,6	1,2	2,9
M7	37 \pm 1,9	32 \pm 1,5	13 \pm 2,0	10 \pm 1,7	1,1	2,8	3,7

Dados expressos em média \pm DP (n=3)

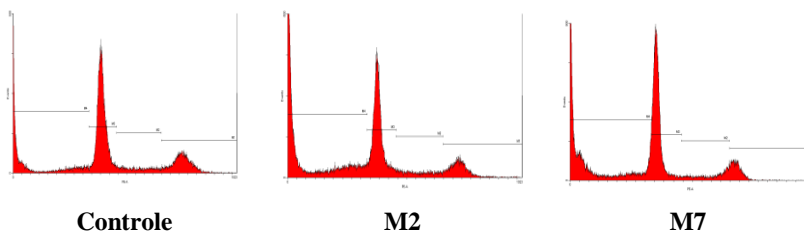
4.1.2 Ciclo celular

Com o intuito de avaliar possíveis alterações no ciclo celular das linhagens de melanoma expostas aos compostos M2 e M7, as células SK-MEL-28 e SK-MEL-147 foram incubadas com as CC₅₀ dos respectivos compostos por um período de 24 h. A linhagem SK-MEL-19 não foi elencada para a realização deste ensaio devido a problemas experimentais. A Figura 18 apresenta os histogramas representativos ilustrando a intensidade de fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo (PI) em função da distribuição das células SK-MEL-28 e SK-MEL-147 em cada fase do ciclo celular. A porcentagem de células nas fases Sub/G1, G0/G1, S e G2/M são apresentadas na Figura 19. Para a linhagem SK-MEL-28 foi possível observar uma diminuição de células nas fases G0/G1 e G2/M após o tratamento com os compostos M2 e M7,

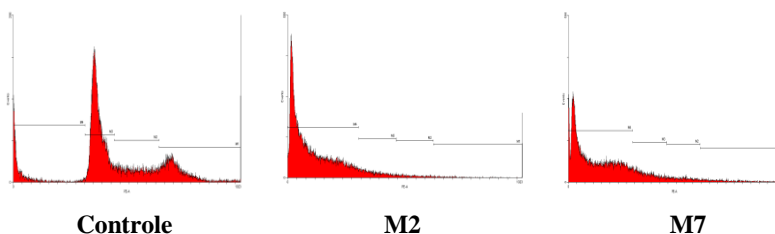
acompanhada de um aumento significativo em Sub/G1 (Figura 18A e Figura 19A). Os compostos M2 e M7 foram responsáveis por induzir este aumento em 26 e 25 % respectivamente, em relação às células não tratadas. Diferentemente, quando as células da linhagem SK-MEL-147 foram expostas ao M2 e ao M7, observou-se um aumento acentuado em Sub/G1 (72 % e 66 %, respectivamente), com consequente diminuição nas fases G0/G1, S e G2/M (Figura 18B e Figura 19B). Estes resultados sugerem que ambas as linhagens celulares apresentaram fragmentação do DNA ao serem tratadas com os compostos M2 e M7, com destaque para a SK-MEL-147, sugerindo a morte celular por apoptose. Esse aspecto já é bem conhecido na literatura, uma vez que diversos autores relataram que esta característica na fase Sub/G1 refere-se às células em apoptose (ORMEROD, 2002; YANG *et al.*, 2003; CAO MR, 2011).

Figura 18 – Ciclo celular nas linhagens SK-MEL-28 (A) e SK-MEL-147 (B).

A



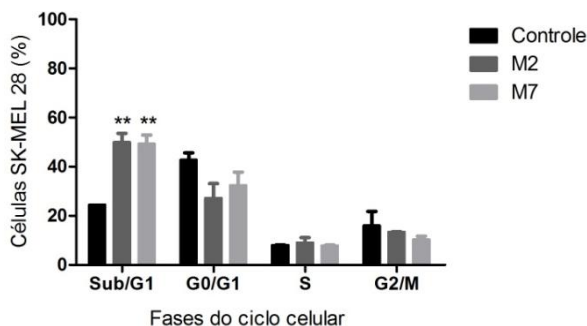
B



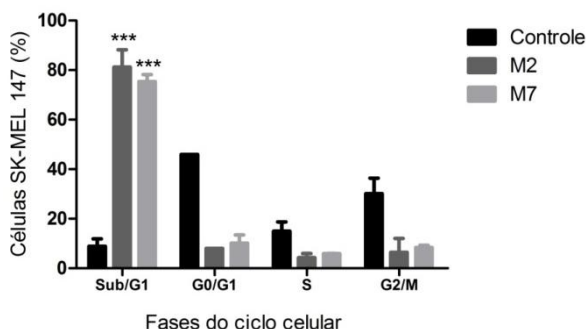
O histograma apresenta a distribuição de células em cada fase do ciclo celular após a incubação com a CC_{50} dos compostos M2 e M7 por um período de 24 h. Sub/G1 caracteriza as células fragmentadas enquanto que G0/G1, G2/M e S indicam as fases do ciclo celular. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e avaliadas pelo programa WinMDI 2.9.

Figura 19 – Quantificação de células nas diferentes fases do ciclo celular nas linhagens SK-MEL-28 (A) e SK-MEL-147 (B).

A



B



A figura apresenta a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após a incubação com a CC_{50} dos compostos M2 e M7 por um período de 24 h. G0/G1, G2/M e S indicam as fases do ciclo celular, enquanto que Sub/G1 caracteriza a porcentagem de células fragmentadas. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e avaliadas pelo programa WinMDI 2.9. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet. ** $p < 0,01$

4.1.3 Morte celular – Apoptose/Necrose nas células SK-MEL-147

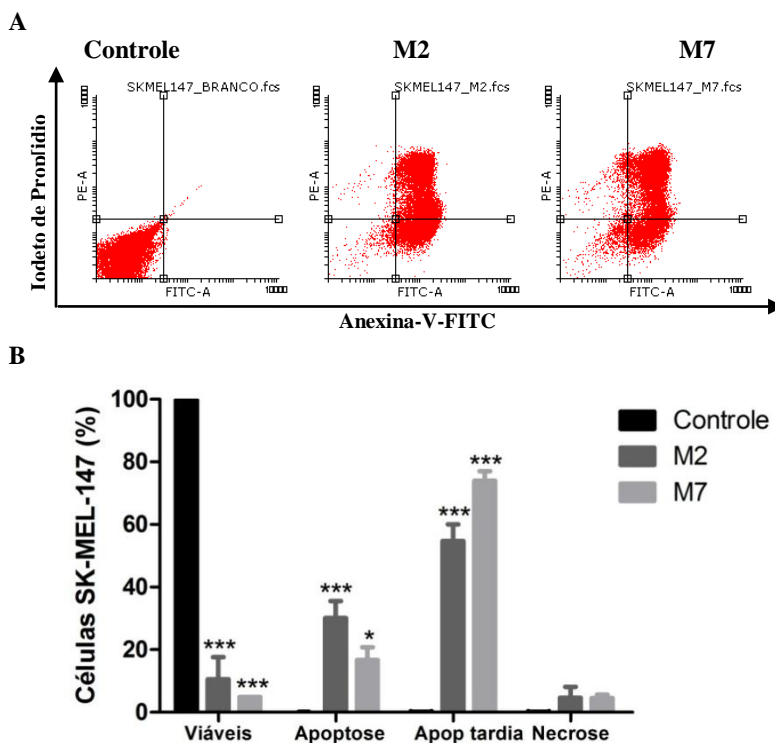
Com o objetivo de verificar a apoptose e/ou necrose induzida pelos derivados da N-fenilmaleimida, selecionou-se a SK-MEL-147,

pois nesta linhagem, ambos os compostos apresentaram a menor CC_{50} , o melhor índice de seletividade, como também, um aumento acentuado na população de células em Sub/G1, caracterizando fragmentação de DNA e possível morte celular por apoptose.

Nos tratamentos com os compostos M2 e M7 as populações celulares distribuem-se principalmente no quadrante inferior direito e no quadrante superior direito (característicos de morte celular por apoptose e/ou apoptose tardia, respectivamente) (Figura 20A). A Figura 20B apresenta a porcentagem de células SK-MEL-147 em cada quadrante, após o tratamento com os derivados da N-fenilmaleimida. Os resultados apresentaram valores sem significância para necrose, no entanto mostraram-se acentuados para apoptose e apoptose tardia. Nas células expostas ao composto M2, a apoptose foi verificada em $30 \% \pm 7,5$ e a apoptose tardia em $55 \% \pm 7,5$ das células. O composto M7 mostrou ação similar promovendo apoptose em $17 \% \pm 6$ das células e $73 \% \pm 4$ para células em apoptose tardia.

Os ensaios empregando Anexina-V são particularmente úteis para a avaliação da apoptose. Nas fases iniciais, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana ficando exposta a marcadores celulares como a Anexina-V (nesta fase a membrana celular continua intacta). Entretanto, em estágios mais avançados da apoptose, a membrana celular perde a integridade, torna-se permeável e assim permite a conjugação do PI ao DNA caracterizando a apoptose tardia (VERMES *et al.*, 1995; BEVERS *et al.*, 1999; FALEIRO e LAZEBNIK, 2000; VERMES *et al.*, 2000). Desta forma, destaca-se que os compostos M2 e M7 induzem o processo apoptótico nas células de melanoma humano SK-MEL-147 conforme os dados apresentados pela Figura 19B, que ilustra um aumento acentuado em Sub/G1 caracterizado pela fragmentação de DNA.

Figura 20 – Apoptose/necrose induzida pelos derivados da N-fenilmaleimida (M2 e M7) na linhagem SK-MEL-147.



As células foram incubadas 24 h com a CC_{50} dos compostos M2 e M7, marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo. (A) O quadrante inferior esquerdo do *dot plot* representa as células viáveis; o quadrante inferior direito, células em apoptose; o quadrante superior direito, as células em apoptose tardia e o quadrante superior esquerdo, células em necrose. (B) Porcentagem de células em apoptose/necrose. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

Em pesquisa anterior realizada por nosso grupo, foi demonstrada a indução da apoptose pelos derivados da N-fenilmaleimida em células da linhagem de leucemia murina L1210. Aquele estudo compreendeu a avaliação de seis derivados maleimídicos com diferentes substituintes no anel aromático (M2, M4, M5, M6, M7 e M9) que evidenciaram o

evento apoptótico por meio de diferentes métodos utilizando a concentração de 10 μM para cada composto em diferentes tempos de incubação Noldin, (2011).

As imidas cíclicas e seus derivados também foram testados por Machado *et al.* (2011). Nesse estudo, foram analisados nove compostos em células de melanoma murino B16F10 e o composto com efeito citotóxico mais significativo (derivado imídico 4) apresentou aumento em Sub/G1, seguido de morte celular por apoptose. Em outro trabalho Machado *et al.* (2013) avaliaram diferentes imidas cíclicas contra duas linhagens celulares de leucemia aguda humana (K562 e Jurkat), os compostos apresentaram efeitos citotóxicos relevantes, induzindo a um aumento em Sub/G1 seguido de morte celular por apoptose.

Diante disso, caracterizar novos agentes antitumorais com maior eficácia é de grande interesse na terapia do melanoma (CAO MR, 2011), uma vez que nestas situações há uma perda de equilíbrio entre a divisão e a morte celular. As vias de sinalização referentes aos processos de apoptose estão suprimidas em células tumorais diminuindo os eventos apoptóticos. Portanto, compreender os eventos que desencadeiam a apoptose em condições de malignidade é muito importante, pois não ajuda somente na compreensão da patogênese, mas também pode revelar novos alvos terapêuticos (WONG, 2011).

4.1.4 Expressão do gene FASN na SK-MEL-147

Para verificar a expressão do gene FASN, as células da linhagem SK-MEL-147 foram incubadas com os derivados da N-fenilmaleimida em diferentes concentrações por um período de 4 h. Após esta etapa, foi realizada a extração do RNA, síntese do cDNA e anterior ao qPCR, realizou-se uma PCR convencional com o intuito de verificar a temperatura ideal de amplificação dos iniciadores (APÊNDICE A), seguido da curva de eficiência (APÊNDICE B).

A Figura 21 apresenta o efeito dos derivados da N-fenilmaleimida na expressão do gene FASN em células SK-MEL-147. É possível observar que o composto M2 na concentração de 5,5 μM não causou alteração na expressão do gene, porém na concentração de 11 μM (CC_{50}) promoveu uma diminuição de 19 % \pm 3,6. De maneira mais significativa, o composto M7 (5 μM) reduziu a expressão do FASN em 38,7 % \pm 5,5.

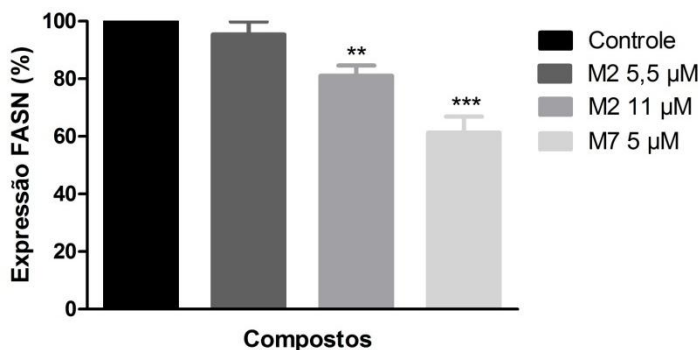
Tem sido reportado que a FASN é altamente expressa em muitos tipos de tumores sólidos como no câncer de mama, próstata, ovário, tireóide, pulmão, estômago e no melanoma. (KRIDEL *et al.*, 2007; MENENDEZ e LUPU, 2007; MIGITA *et al.*, 2009). Em pesquisa realizada por Andrade *et al.* (2011) foram analisadas lesões cutâneas de pacientes com melanoma e verificou-se que a FASN estava expressa em 80% das células neoplásicas em todos os casos de melanoma estudados.

Menendez e Lupu (2007) relataram que nos últimos anos, estudos têm demonstrado a superexpressão da FASN como um marcador maligno para o diagnóstico de muitos cânceres, incluindo o melanoma. A FASN associada ao tumor confere vantagens para as células cancerígenas como crescimento e sobrevivência, ao invés de funcionar como uma via de armazenamento de energia, sugerindo também desempenhar um papel ativo no desenvolvimento, manutenção e progressão metastática. Além disso, a inibição da enzima causa citotoxicidade seletiva em células cancerígenas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com efeito mínimo nas células não tumorais. Foi relatado também que as células cancerígenas dependem dos lipídios sintetizados pela FASN para sobreviver (PIZER *et al.*, 1996; PIZER *et al.*, 2000), devido à alta taxa proliferativa, células cancerígenas como as do melanoma utilizam ácidos graxos provenientes da síntese endógena por meio da FASN para a síntese de suas membranas (CHIRALA *et al.*, 2003; MENENDEZ *et al.*, 2005; OOKHTENS *et al.*, 1984).

A FASN é a principal enzima envolvida na via lipogênica (LIU *et al.*, 2010). Além das inúmeras tentativas de diminuição da expressão do gene da FASN, a inibição da atividade desta enzima também tem sido descrita. Estudos com alguns inibidores da FASN demonstraram que sua inibição reduz a proliferação e induz a morte por apoptose em células tumorais (FURUYA *et al.*, 1997; PIZER *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2001). Inibidores específicos da FASN como a cerulenina, o C75, triclosan, o orlistate, a epigalocatequina-3-galato e outros compostos naturais como a quercetina e a luteolina têm demonstrado atividade antitumoral em diferentes tipos de câncer (LUPU e MENENDEZ, 2006). Ho *et al.* (2007) constataram em seus estudos que inibidores da FASN como a cerulenina e o C75 retardaram o crescimento das células de melanoma humano A-375 e promoveram apoptose envolvendo a ativação de caspases. Já Zecchin *et al.* (2011) e Carvalho *et al.* (2008) mostraram que o orlistate reduziu a proliferação celular e metástases nos linfonodos em modelo de melanoma subcutâneo *in vivo*, como também induziu a apoptose em células de melanoma murino B16F10.

Os resultados encontrados na literatura somados aos deste estudo mostraram evidências que a redução da expressão do gene FASN pode ser sugerida como um alvo interessante na terapia do melanoma. Além disso, a superexpressão pode ser utilizada como um marcador no diagnóstico das lesões cutâneas e orais desta doença que também foi relatado nos estudos de Andrade *et al.* (2011) e Seguin *et al.* (2012).

Figura 21 – Expressão do gene FASN na linhagem celular SK-MEL-147.



As células foram incubadas com 5,5 µM e 11 µM do composto M2 e com 5 µM do composto M7 e incubadas por 4 h. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativa em tempo real utilizando como controle endógeno o gene constitutivo GAPDH. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet. *** $p < 0,001$

4.2 Atividade Antiadipogênia

4.2.1 Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade dos derivados da N-fenilmaleimida na linhagem de pré-adipócito 3T3-L1, avaliaram-se 7 concentrações distintas: 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75 µM, em um tempo de incubação de 24 h. A Tabela 4 ilustra as CC_{50} s encontradas para os compostos M2 e M7. Verificou-se que ambos os compostos apresentaram baixos valores de CC_{50} ($7,0 \pm 1,0$ µM para o M2 e $4 \pm 0,5$ µM para o M7). Os valores de CC_{50} encontrados foram particularmente úteis para a escolha das concentrações utilizadas nos experimentos

seguintes, que se referem à análise do ciclo celular e aos ensaios de diferenciação celular.

Tabela 4 – Determinação da CC_{50} dos derivados da N-fenil-maleimida sobre a linhagem murina de pré-adipócito 3T3-L1.

Composto	$CC_{50}\mu M$
	3T3-L1
M2	$7,0 \pm 1,0$
M7	$4,0 \pm 0,5$

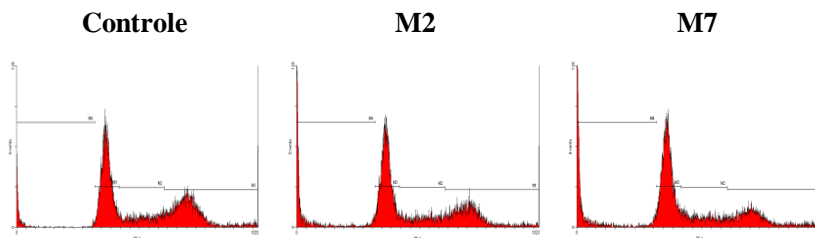
Dados expressos em média \pm DP (n=3)

4.2.2 Análise do Ciclo celular

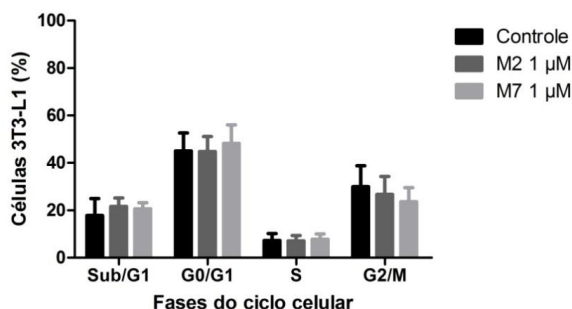
Para a análise do ciclo celular de pré-adipócitos 3T3-L1, utilizou-se a concentração de 1 μM dos compostos M2 e M7, garantindo a viabilidade celular. Os pré-adipócitos foram incubados com os derivados da N-fenilmaleimida por um período de 24 horas. Observou-se que a concentração de 1 μM de ambos os compostos não causou alteração em nenhuma das fases do ciclo celular quando comparadas ao controle (Figura 22 A e B).

Figura 22 – Análise do ciclo celular na linhagem 3T3-L1 após o tratamento de 24 h com 1 μ M dos compostos M2 e M7.

A



B



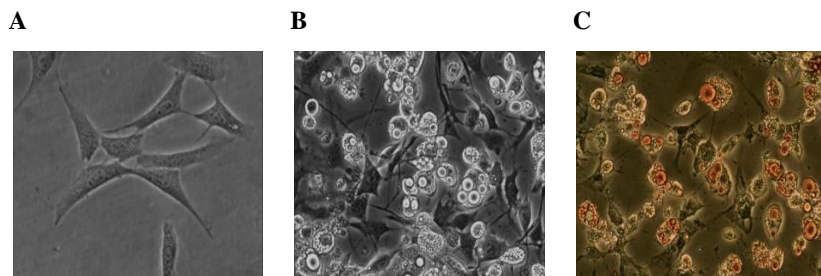
(A) Distribuição das células e (B) suas quantificações em cada fase do ciclo celular. Sub/G1 caracteriza as células fragmentadas enquanto que G0/G1, G2/M e S indicam as fases do ciclo celular. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e avaliadas pelo programa WinMDI 2.9. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet.

4.2.3 Diferenciação celular da linhagem 3T3-L1

Para a realização da diferenciação celular de pré-adipócito para adipócito, as células 3T3-L1 em cultura foram submetidas ao meio de diferenciação (MDI), coradas com *Oil Red O* e visualizadas em microscópio óptico. A Figura 23A mostra a linhagem 3T3-L1 em cultura com uma morfologia inicial semelhante a um fibroblasto. Após o processo de diferenciação, os adipócitos apresentam forma esférica e armazenam lipídios em forma de gotículas, conforme visualizadas na

Figura 23B. Na Figura 23C podem ser visualizados adipócitos corados com *OilRed O*, evidenciando o lipídio intracelular. Este processo com duração de 8 dias compreende uma sucessão de estágios precisamente controlados e demonstra a capacidade de diferenciação celular após a indução do MDI.

Figura 23 – Diferenciação de células 3T3-L1.



(A) Pré-adipócitos em cultura. (B) Pré-adipócitos já diferenciados para adipócitos (C) Adipócitos diferenciados sob o corante *OilRed O*. Aumento de 400x.

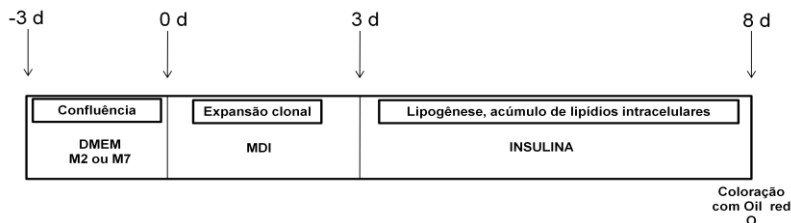
4.2.4 Incubação com derivados maleimídicos anterior a indução da diferenciação celular

Para avaliar a atividade dos compostos no momento anterior a diferenciação celular na linhagem de pré-adipócito 3T3-L1, as células foram expostas ao M2 e ao M7 nas concentrações de 1 e 3 μM conforme esquema apresentado na Figura 24A. Após a exposição das células aos derivados da N-fenilmaleimida, o MDI foi adicionado sem os compostos. O objetivo deste ensaio foi avaliar as possíveis alterações durante as fases iniciais da diferenciação. A Figura 24 B e C mostram a eluição do corante *Oil red O* após os 8 dias de diferenciação das células incubadas com M2 e M7, respectivamente. Não foram observadas alterações no conteúdo intracelular de lipídios. Destaca-se que nas fases iniciais da adipogênese, importantes marcadores precoces ao processo de diferenciação são expressos como a lipase lipoprotéica, imprescindíveis para a total diferenciação de pré-adipócitos. Nesta etapa, salienta-se a importância do contato célula-célula para a posterior

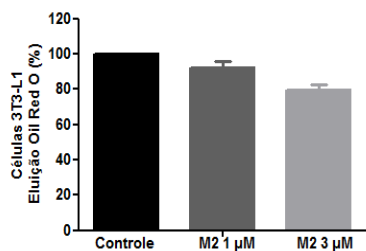
expressão de fatores de transcrição durante a indução da diferenciação (REICHERT e EICK, 1999; ARSENIJEVIC *et al.*, 2012).

Figura 24 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos aos compostos M2 e M7 anterior a adição do MDI.

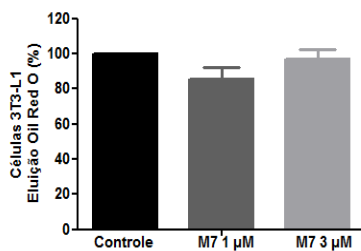
A



B



C



(A) Esquema de incubação das células 3T3-L1 com os compostos. (B) Células expostas ao M2. (C) Células expostas ao M7. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

4.2.5 Incubação com derivados maleimídicos durante a diferenciação celular da linhagem 3T3-L1

Com o intuito de avaliar a ação dos derivados da N-fenil-maleimida na adipogênese, realizou-se a incubação com os compostos M2 e M7 durante a diferenciação celular de pré-adipócito 3T3-L1 para adipócito. As células foram expostas ao M2 e ao M7 nas concentrações de 1 e 3 µM no mesmo momento em que foi adicionado o meio de diferenciação (MDI) (Figura 25). Como controle positivo, utilizou-se a quercetina na concentração de 2 µM. A quercetina é um composto

natural, extraído principalmente da maçã que possui atividade antiadipogênica já estabelecida.

Na Figura 26A e na Figura 27A é possível visualizar uma diminuição do corante *Oil Red O* intracelular em culturas celulares diferenciadas e submetidas aos compostos M2 e M7. Esta diminuição sugere menor acúmulo de lipídios intracelulares durante o processo de diferenciação. Como esperado, a quercetina diminuiu o acúmulo de lipídios em $44,6 \% \pm 5$, quando comparada com o controle. Com relação aos compostos observou-se uma diminuição do resíduo de *Oil Red O* intracelular de $24 \% \pm 3,9$ na concentração de $1 \mu\text{M}$ e de $28 \% \pm 5,2$ na concentração de $3 \mu\text{M}$ quando as células foram submetidas ao composto M2 (Figura 26B). Já o composto M7 promoveu uma diminuição de $29 \% \pm 8$ na concentração de $1 \mu\text{M}$ e de $36 \% \pm 5$ na concentração de $3 \mu\text{M}$ (Figura 27B). Além da avaliação da eluição do corante *Oil red O*, as células expostas aos compostos M2 e M7 (tratadas conforme ilustrado na Figura 25) foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e visualizadas em microscópio de fluorescência. A Figura 28 ilustra as alterações morfológicas após a exposição das células aos compostos. Observou-se uma diminuição de lipídios intracelulares, similares a vacúolos, nas células expostas aos compostos quando comparadas às células controle. Estas observações corroboram os resultados encontrados após a coloração com o corante específico para lipídios *Oil red O*. Ainda, as células expostas ao composto M7 apresentaram alterações morfológicas sugestivas de fragmentação de DNA.

Azain (2004) relatou que sob o estímulo do MDI os ácidos graxos (sintetizados a partir da FASN) ativam a diferenciação de pré-adipócitos, além disso, Amri *et al.* (1994) e Teboul *et al.* (1995) elucidaram que há muitas evidências de que a atividade da FASN é necessária para a expressão do fator de transcrição PPAR γ .

Sob este aspecto, alguns estudos com outros compostos têm demonstrado efeitos semelhantes aos derivados maleimídicos. Choi *et al.* (2013) demonstraram que a *Artemisia* spp. pertencente a família das Asteraceae induziu uma redução do lipídio intracelular em células 3T3-L1 e também inibiu significativamente a proliferação de células de câncer de mama (T47D e HS578T) numa concentração acima de $100 \mu\text{M}$ por um período de incubação de 72 h. O flavonóide avicularina (quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosideo) também promoveu a supressão de lipídio intracelular em adipócitos 3T3-L1 além de reduzir a expressão do gene adipogênico *CAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP- α) (FUJIMORI e SHIBANO, 2013).

Um estudo anterior relacionando à atividade antiadipogênica da quercetina em modelo de diferenciação da 3T3-L1 demonstrou que a diminuição de lipídios intracelulares estavam envolvidos com a diminuição da expressão dos fatores de transcrição C/EBP α e PPAR γ , além da diminuição da expressão da FASN. Ainda, a quercetina promoveu a indução da apoptose de células 3T3-L1 diferenciadas, sugerindo não somente a atividade antiadipogênica, mas também de citotoxicidade (AHN *et al.*, 2008).

Os resultados deste estudo mostraram que os derivados maleimídicos promoveram a diminuição de lipídios intracelulares, sugerindo que o M2 e o M7 atuem no período após a adição do MDI quando ocorre a expressão dos fatores de transcrição da adipogênese. Por outro lado, estes resultados que revelam a diminuição de lipídios intracelulares também levantam a hipótese de haver uma possível relação com a expressão da enzima FASN.

Figura 25 – Esquema de incubação das células 3T3-L1 com os compostos M2 e M7 durante a adição do MDI.

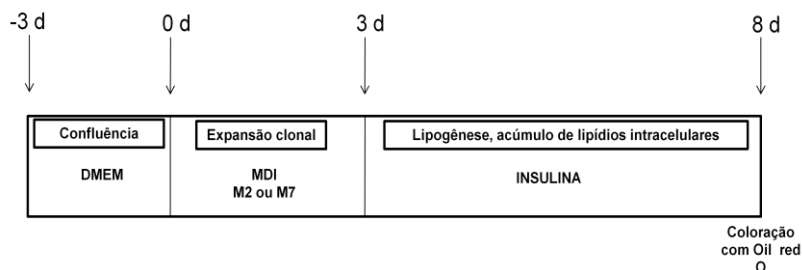
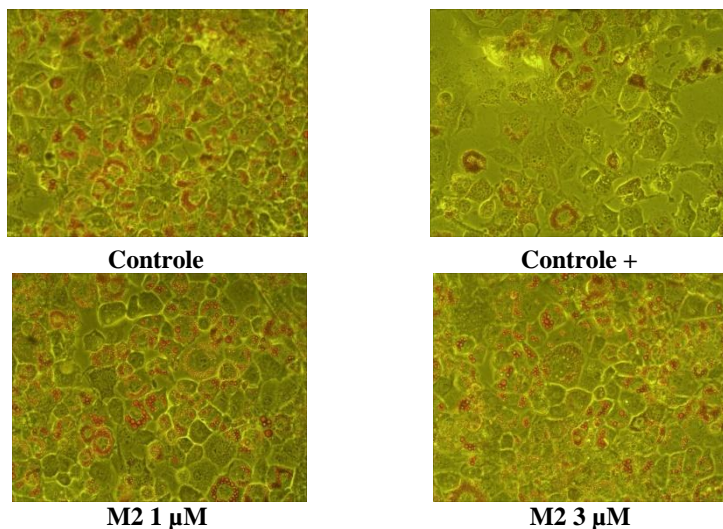
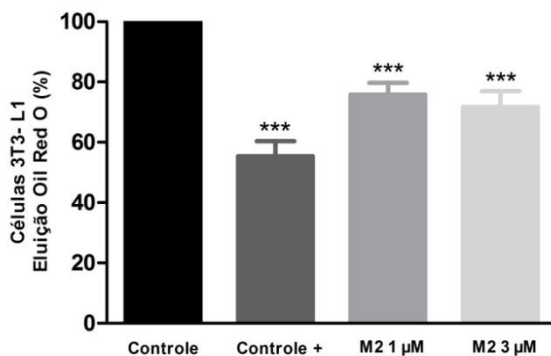


Figura 26 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos ao composto M2 durante a adição do MDI.

A



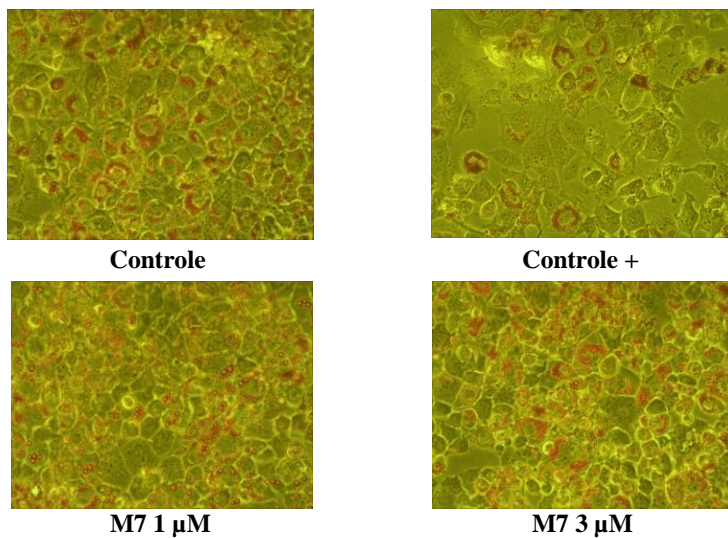
B



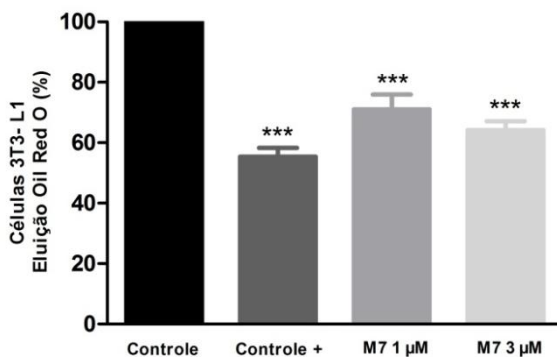
(A) Células controle (sem tratamento), células expostas ao composto M2 (1 e 3 μ M) e ao controle positivo quercetina (2 μ M) durante a diferenciação. (B) Valores da absorbância do resíduo de *Oil Red O* intracelular dissolvido em metanol. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet. *** $p < 0,001$. Aumento de 200x.

Figura 27 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos ao composto M7 durante a adição do MDI.

A

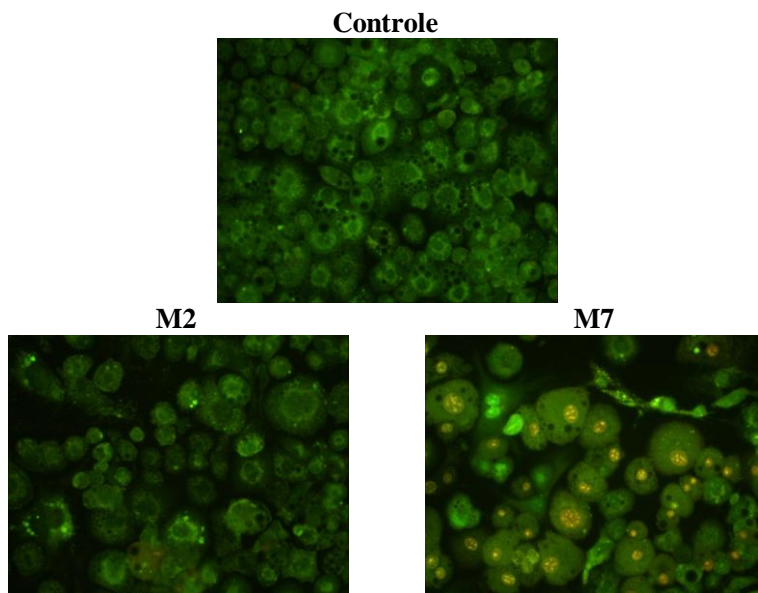


B



(A) Células controle (sem tratamento), células expostas ao composto M7 (1 e 3 μM) e ao controle positivo quercetina (2 μM) durante a diferenciação. (B) Valores da absorbância do resíduo de *Oil Red O* intracelular dissolvido em metanol. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnet.*** $p < 0,001$. Aumento de 200x.

Figura 28 – Microscopia de fluorescência de células 3T3-L1 diferenciadas expostas aos compostos M2 e M7 na concentração de 3 μ M durante o processo de diferenciação.



Dupla coloração de laranja de acridina e brometo de etídio. Células viáveis coram-se em verde e células necróticas coram-se em vermelho. Após a coloração a células foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). Aumento 200x.

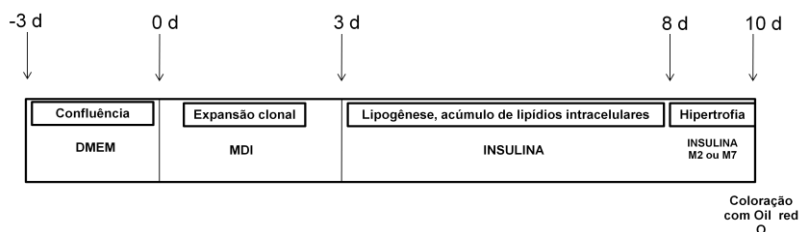
4.2.6 Incubação com derivados maleimídicos após a indução da diferenciação celular

As células 3T3-L1 foram expostas ao MDI e após o processo de diferenciação total (8 dias) foram expostas aos compostos M2 e M7 (Figura 29A). Durante o processo de diferenciação, todos os fatores de transcrição são expressos e estes promovem a ativação das enzimas lipogênicas essenciais ao acúmulo de lipídios. Após o 8º dia de diferenciação, as células totalmente diferenciadas continuamente acumulam lipídios intracelulares. O objetivo da incubação com os compostos M2 e M7 após a diferenciação foi avaliar possíveis alterações no processo de hipertrofia celular (aumento no tamanho dos adipócitos) (FARMER, 2005; FARMER, 2006).

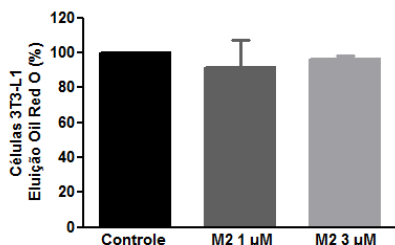
A Figura 29B e a Figura 29C ilustram a eluição do corante *Oil Red O* após a exposição das células aos compostos. Não foram observadas alterações no conteúdo de lipídios intracelulares quando comparadas com as células controle, sugerindo não haver envolvimento dos compostos M2 e M7 no processo de hipertrofia.

Figura 29 – Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 expostos aos compostos M2 e M7 após a adição do MDI.

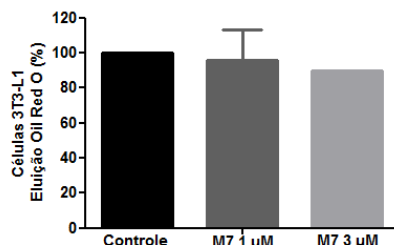
A



B



C



(A) Esquema de incubação das células 3T3-L1 com os compostos. (B) Células expostas ao M2. (C) Células expostas ao M7. Para análise estatística foi utilizado *one-way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- a) Os derivados da N-fenilmaleimida (M2 e M7) apresentaram relevante citotoxicidade contra três linhagens celulares de melanoma enquanto que os derivados do ácido N-fenilmaleâmico (AC1 e AC3) não apresentaram tal atividade. Esta característica deve-se a integridade do anel imídico presente nos derivados da N-fenilmaleimida;
- b) Para a linhagem SK-MEL-147, o M2 e o M7 foram três vezes mais seletivos do que para a linhagem não-tumoral NGM;
- c) A SK-MEL-28 e a SK-MEL-147 apresentaram fragmentação de DNA, com maior expressão na segunda linhagem, sugestivo de morte celular por apoptose;
- d) Os compostos M2 e M7 induziram apoptose na linhagem SK-MEL-147;
- e) Os compostos M2 e M7 diminuíram a expressão do gene FASN;
- f) Em relação a atividade adipogênica, os compostos M2 e o M7 diminuíram a diferenciação celular de pré-adipócitos evidenciado pela diminuição de lipídios intracelulares. Ainda, as células expostas ao composto M7 apresentaram alterações morfológicas sugestivas de fragmentação de DNA.

5.1 Perspectivas

No decorrer deste trabalho surgiram algumas indagações que podem ser contempladas em futuros trabalhos, como:

- a) Investigar os mecanismos de morte celular induzidos pelos derivados maleimídicos;
- b) Avaliar a atividade da enzima FASN;
- c) Verificar a expressão gênica dos fatores de transcrição da adipogênese (C/EBP- β , C/EBP- δ , PPAR γ e o C/EBP α).

REFERÊNCIAS

AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 373, n. 4, p. 545-9, Sep 5 2008.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 11, n. 2, p. 81-91, 9// 2013.

ALO, P. L. et al. Immunohistochemical Expression and Prognostic Significance of Fatty Acid Synthase in Pancreatic Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 27, n. 4B, p. 2523-2527, July 1, 2007 2007.

AMRI, E.-Z.; AILHAUD, G.; GRIMALDI, P.-A. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. **Journal of Lipid Research** v. 35, p. 930-937, 1994.

ANDRICOPULO, A. D. et al. Síntese e atividade antibacteriana de imidas cíclicas: 3,4-dicloromaleimidas e 3-cloro-4-substituída-maleimidas. **Química Nova**, v. 21, p. 573-577, 1998.

AROZARENA, I. et al. Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 45-57, 1/18/ 2011.

ARSENIJEVIC, T. et al. Murine 3T3-L1 Adipocyte Cell Differentiation Model: Validated Reference Genes for qPCR Gene Expression Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37517, 2012.

AZAIN, M. J. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 3, p. 916-924, March 1, 2004 2004.

BARON, A. et al. Fatty acid synthase: A metabolic oncogene in prostate cancer? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 47-53, 2004.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 241-248, 11/1/ 2007.

BEVERS, E. M. et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1439, n. 3, p. 317-330, 1999.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. **Oncology (Williston Park)**, v. 23, p. 488-496, 2009.

BOEING, H. Obesity and cancer – The update 2013. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 219-227, 4// 2013.

BOX, N. F.; TERZIAN, T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 5, p. 525-533, 2008.

BRAND et al. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 2, p. 176-183, 2013.

BRASILEIRO FILHO, G.; BOGLIOLO, G. **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BROHEM, C. A. et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. 354-369, 2012.

BROUSTAS, C. G.; LIEBERMAN, H. B. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. **Radiation Research**, 2014.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231-237, 03//print 2005.

BRUSSELMANS, K. et al. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 106, n. 6, p. 856-862, 2003.

CAMPOS, F. D.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V. Síntese de moléculas bioativas: O exemplo das imidas Cíclicas. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**, p. 57-105, 2003.

CAO MR, L. Q., LIU ZL, LIU HH, WANG W, LIAO XL, PAN YL, JIANG JW. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 10, n. 6, p. 599-604, 2011-12-15 2011.

CARVALHO, M. A. et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 11, p. 2557-2565, 2008.

CECHINEL FILHO, V. et al. Antibacterial activity of N-phenylmaleimides, N-phenylsuccinimides and related compounds. Structure-activity relationships. **Il Farmaco**, v. 49, p. 675-677, 1994.

CECHINEL FILHO, V. et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, p. 230-241, 2003.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507-2516, 2011.

CHIRALA, S. S. et al. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6358-6363, May 27, 2003 2003.

CHOI, E. et al. Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of *Artemisia* species in vitro. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33, n. 1, p. 92-97, 2// 2013.

CHOI, J. et al. Identification of PLX4032-resistance mechanisms and implications for novel RAF inhibitors. **Pigment Cell & Melanoma Research**, p. n/a-n/a, 2013.

COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 366-373, 8// 2005.

CORRADIN, M. T. et al. In situ malignant melanoma on nevus spilus in an elderly patient. **Acta Dermatovenereologica**, v. 10162, p. 17-19, 2014.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, p. 949 - 954, 2002.

DE ANDRADE, B. A. B. et al. Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. **Oral Diseases**, v. 17, n. 8, p. 808-812, Nov 2011.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 378-390, 05//print 2008.

DONOHUE, C. L. et al. Obesity and gastrointestinal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 97, n. 5, p. 628-642, 2010.

DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3016-3023, //print 2003.

ELDAHSHAN, O. A. Rhoifolin; A Potent Antiproliferative Effect on Cancer Cell Lines. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 46-53, 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathologic**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1397-1407, 5/1/ 2010.

FALEIRO, L.; LAZEBNIK, Y. Caspases Disrupt the Nuclear-Cytoplasmic Barrier. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 5, p. 951-960, November 27, 2000 2000.

FARMER, S. R. Regulation of PPAR[gamma] activity during adipogenesis. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 29, n. S1, p. S13-S16, 2005.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263-273, 10// 2006.

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. E255-E263, 11//print 2001.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876-885, 11//print 2005.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

FOX, M. C. et al. Management options for metastatic melanoma in the era of novel therapies: A primer for the practicing dermatologist: Part I: Management of stage III disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 1, p. 1.e1-1.e9, 1// 2013.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.

FUJIMORI, K.; SHIBANO, M. Avicularin, a Plant Flavonoid, Suppresses Lipid Accumulation through Repression of C/EBP α -Activated GLUT4-

Mediated Glucose Uptake in 3T3-L1 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5139-5147, 2013/05/29 2013.

FURUYA, Y. et al. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. **Anticancer Res**, v. 17, p. 4589-4593, 1997.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, p. 1-14, 2011.

GANSLER, T. S. et al. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. **Human pathology**, v. 28, n. 6, p. 686-692, 1997.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. . **Melanoma Res**, v. 17, p. 117-127, 2007.

GILBERT, C. A.; SLINGERLAND, J. M. Cytokines, Obesity, and Cancer: New Insights on Mechanisms Linking Obesity to Cancer Risk and Progression. **Annual Review of Medicine**, v. 64, n. 1, p. 45-57, 2013.

GILCHREST, B. A. et al. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1341-1348, 1999.

GRANDMAISON, P. A.; NANOWSKI, T. S.; VANCE, J. E. Externalization of phosphatidylserine during apoptosis does not specifically require either isoform of phosphatidylserine synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1636, n. 1, p. 1-11, 2004.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 02/22/print 2007.

GUADAGNOLO, B. A.; ZAGARS, G. K. Adjuvant radiation therapy for high-risk nodal metastases from cutaneous melanoma. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 409-416, 2009.

HAUPT, S. et al. Apoptosis - the p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 20, p. 4077-4085, October 15, 2003 2003.

HO, T.-S. et al. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 9, p. 578-587, 10// 2007.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev**, v. 12, p. 93-100, 2003.

IARC. Weight control and physical activity. In: PRESS, I. (Ed.). **Handbooks of Cancer Prevention**, v.6, 2002.

INAMDAR, G. S.; MADHUNAPANTULA, S. V.; ROBERTSON, G. P. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 624-637, 9/1/ 2010.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> >. 2014a. Acessado em: 17/01/2014.

_____. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativas de Câncer para 2014. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014 >. 2014b. Acessado em: 17/01/2014.

_____. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer - Pele melanoma. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma >. 2014c. Acessado em: 17/01/2014.

JAUCH-CHARA, K.; OLTMANNS, K. M. Obesity – A neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. **Progress in Neurobiology**, n. 0,

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

JOVANOVIC, B. et al. Coexisting NRAS and BRAF Mutations in Primary Familial Melanomas with Specific CDKN2A Germline Alterations. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 2, p. 618-620, 09/17/online 2009.

KAPUR, P. et al. Fatty acid synthase expression in cutaneous melanocytic neoplasms. **Modern Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1107-1112, 2005.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, 11/18/print 2004.

KAUFMANN, W. K. et al. Defective Cell Cycle Checkpoint Functions in Melanoma Are Associated with Altered Patterns of Gene Expression. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 1, p. 175-187, 06/28/online 2007.

KOCH, A. et al. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 95-99, 10/3/ 2005.

KRIDEL, S.; LOWTHER, W.; PEMBLE, C. Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology. **Expert Opin Investing Drugs**, v. 16 p. 1817-1829, 2007.

KRIDEL, S. J. et al. Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. **Cancer Research**, v. 64, n. 6, p. 2070-2075, March 15, 2004 2004.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 3// 2008.

KUHAJDA, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. **Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 202-208, 3/1/ 2000.

KUHAJDA, F. P. et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6379-6383, July 5, 1994 1994.

LI, J. et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. **Cancer Res.**, v. 4, p. 1493-1499, 2001.

LIN, J.-K.; LIN-SHIAU, S.-Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 2, p. 211-217, 2006.

LIU, B. et al. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 187-193, 2002/03/01 2002.

LIU, H. et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. v. 1, p. 69-89, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 12// 2001.

LOUIE, S. M.; ROBERTS, L. S.; NOMURA, D. K. Mechanisms linking obesity and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1499-1508, 10// 2013.

LUI, P. et al. Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer treatment reviews**, v. 33, n. 8, p. 665-680, 2007.

LUPU, R.; MENENDEZ, J. A. Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new

family of anti-cancer agents? **Curr Pharm Biotechnol**, v. 6, p. 483-493, 2006.

MACHADO, K. E. et al. Apoptotic Events Induced by Maleimides on Human Acute Leukemia Cell Lines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 12, p. 1904-1916, 2013/12/16 2013.

MACHADO, K. E. et al. Evaluation of apoptotic effect of cyclic imide derivatives on murine B16F10 melanoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 6285-6291, 11/1/ 2011.

MAHMOUDI, M. et al. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 5, p. 3407-3432, 2011/05/11 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Milestones in cell division : To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222-231, 12//print 2001.

MEF. Melanoma Education Foundation. Lesões cutâneas do melanoma. Disponível em: < <http://www.skincheck.org/Page4.php> >. 2014. Acessado em: 05/02/2014.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 10, p. 763-777, 10//print 2007.

MENENDEZ, J. A.; VELLON, L.; LUPU, R. Orlistat: From Antiobesity Drug to Anticancer Agent in Her-2/neu (erbB-2)-Overexpressing Gastrintestinal Tumors? **Exp Biol Med**, v. 230, p. 151-154, 2005.

MIGITA, T. et al. Fatty Acid Synthase: A Metabolic Enzyme and Candidate Oncogene in Prostate Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 7, p. 519-532, April 1, 2009 2009.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUAWAD, R. et al. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 1, p. 27-39, 4// 2010.

MS. **PORTARIA N° 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013.** Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. Brasília 2013.

MURRELL, J.; BOARD, R. The use of systemic therapies for the treatment of brain metastases in metastatic melanoma: Opportunities and unanswered questions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 833-838, 12// 2013.

NIKOLAOU, V. A. et al. Melanoma: New Insights and New Therapies. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3, p. 854-863, 03//print 2012.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 12// 2013.

NOLDIN, V. F. **ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DE DERIVADOS MALEIMÍDICOS.** 2011. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em farmácia, UFSC, Florianópolis - SC.

NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 441-470, 1992.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3122S-3126S, December 1, 2000 2000.

OGINO, S. et al. Cohort Study of Fatty Acid Synthase Expression and Patient Survival in Colon Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5713-5720, December 10, 2008 2008.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OOKHTENS, M. et al. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. **Am J Physiol.**, v. 247(1 Pt 2), p. 146-53, 1984.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 73-80, 7/1/ 2002.

PAVEY, S. et al. DNA repair and cell cycle checkpoint defects as drivers and therapeutic targets in melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 6, p. 805-816, 2013.

PERCIK, R.; STUMVOLL, M. Obesity and cancer. **Endocrinol Diabetes**, v. 117, p. 563-566, 2009.

PIZER, E. et al. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. **Cancer Res.**, v. 60, p. 213-218, 2000.

PIZER, E. S. et al. Pharmacological Inhibitors of Mammalian Fatty Acid Synthase Suppress DNA Replication and Induce Apoptosis in Tumor Cell Lines. **Cancer Research**, v. 58, n. 20, p. 4611-4615, October 15, 1998 1998.

PIZER, E. S. et al. Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Programmed Cell Death in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 56, n. 12, p. 2745-2747, June 15, 1996 1996.

PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 1, p. 238-259, 1// 2011.

PRADO, S. R. T. et al. Biological Evaluation of Some Selected Cyclic Imides: Mitochondrial Effects and *in vitro* Citotoxicity. **Z. Naturforsch**, v. 59c, p. 663-672, February 16/April 21 2004.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7-8, p. 598-601, 12// 2008.

PRIETO-HONTORIA, P. L. et al. Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: A molecular nutrition approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 664-678, 6// 2011.

PRINS, J.; O'RAHILLY, S. Regulation of adipose cell number in man. **Clin Sci** v. 92(1), p. 3-11, 1997.

PROSKURYAKOV, S. Y. A.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v. 283, n. 1, p. 1-16, 2/1/ 2003.

QUEIROZ, J. C. F. D. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, p. 582-584, 2009.

REICHERT, M.; EICK, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. **Oncogene**, v. 18, n. 2, p. 459-66, Jan 14 1999.

ROSEN, E. D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & Development**, v. 14, n. 11, p. 1293-1307, June 1, 2000 2000.

ROSSI, S. et al. Fatty Acid Synthase Expression Defines Distinct Molecular Signatures in Prostate Cancer1 1 NCI (Director's Challenge CA84995-04, SPORE in Prostate Cancer CA90381-01A1, and PO1 CA89021-02), Novartis Investigator, and CaPCURE awards. **Molecular Cancer Research**, v. 1, n. 10, p. 707-715, August 1, 2003 2003.

SCHMID, B. et al. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 4, p. 1073-1082, 3/25/ 2005.

SEGUIN, F. et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 6, p. 977-987, Sep 2012.

SMALLEY, K. S. M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? **International Journal of Cancer**, v. 104, n. 5, p. 527-532, 2003.

SMITH, S. Architectural Options for a Fatty Acid Synthase. **Science**, v. 311, n. 5765, p. 1251-1252, March 3, 2006 2006.

SORTINO, M. et al. N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 560-568, 1/1/ 2008.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 621-632, 09/print 2010.

TAKAHIRO, T.; SHINICHI, K.; TOSHIMITSU, S. Expression of Fatty Acid Synthase as a Prognostic Indicator in Soft Tissue Sarcomas. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 2204-2212, June 1, 2003 2003.

TAKATA, M.; SAIDA, T. Genetic alterations in melanocytic tumors. **Journal of dermatological science**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2006.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. **Biochemistry**, v. 81, p. 715-736, 2012.

TARHINI, A. A.; AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatologic Therapy**, v. 19, n. 1, p. 19-25, 2006.

TAS, F. Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors. **Journal of Oncology**, v. 2012, p. 9, 2012.

TAVARES, A. A. S.; TAVARES, J. M. R. S. **Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante**. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto - Portugal: Julho 2009

TEBOUL, L. et al. Thiazolidinediones and Fatty Acids Convert Myogenic Cells into Adipose-like Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 47, p. 28183-28187, November 24, 1995 1995.

TEMPESTA, M. S. et al. Phyllanthimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 617-618, 1988/05/01 1988.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-190, 2000.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

WAGNER, J. D. et al. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast Reconstr Surg**, v. 105, p. 1774-1799, 2000.

WANG, Y.; LAI, B.; ANDERSON, V. Inhibition of triclosan to fatty acid synthase from goose uropygial glands and human breast cancer cells in vitro. **Ai Zheng**, v. 22, p. 270-273, 2003.

WHO. World Health Organization. Malignant melanoma. Disponível em: < http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html >. 2014. Acessado em: 17/01/2014.

WILENTZ, R. E.; WITTERS, L. A.; PIZER, E. S. Lipogenic Enzymes Fatty Acid Synthase and Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Are Coexpressed with Sterol Regulatory Element Binding Protein and Ki-67 in

Fetal Tissues. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 3, n. 6, p. 525-531, 2000/11/01 2000.

WONG, R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

YANG, H. et al. 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 7096 - 7107, 2003.

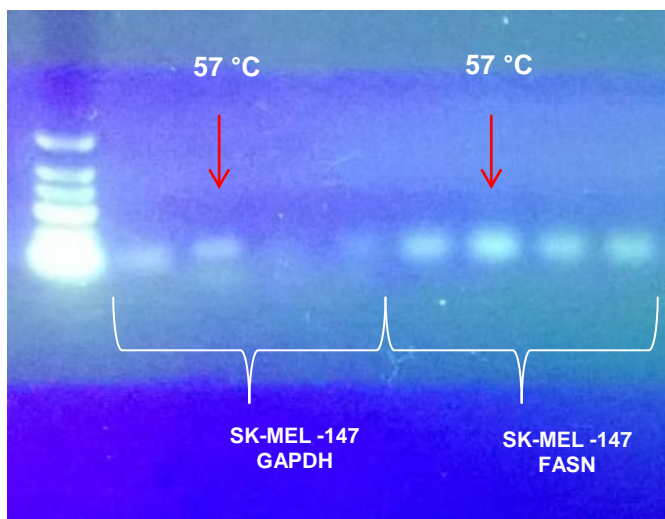
YANG, L. et al. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, n. 2, p. 267-278, 10/28/ 2007.

YEZHELYEV, M. V. et al. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 8, p. 657-667, 8// 2006.

YUNES, J. A. et al. Antiproliferative Effects of a Series of Cyclic Imides on Primary Endothelial Cells and a Leukemia Cell Line. **Z. Naturforsch**, v. 63c, p. 675-680, 3 de Abril 2008.

ZECCHIN, K. G. et al. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. **Lab Invest**, v. 91, n. 2, p. 232-240, 02//print 2011.

APÊNDICE A – Temperatura de amplificação dos genes GAPDH e FASN na linhagem SK-MEL-147.



APÊNDICE B – Gráfico da curva de eficiência dos genes FASN e GAPDH.

